

# Aktivitet av P-glykoprotein i mononukleære celler fra perifert blod

Kathrine Ahlsen



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

# **Aktivitet av P-glykoprotein i mononukleære celler fra perifert blod**

Kathrine Ahlsen

Masteroppgave i farmasi



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

**Veiledere:**

Professor Hege Christensen, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt

Professor Anders Åsberg, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt og

Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet

Stipendiat Ida Robertsen, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt

© Kathrine Ahlsen

2014

Aktivitet av P-glykoprotein i mononukleære celler fra perifert blod

Kathrine Ahlsen

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Forord

Denne oppgaven har blitt utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, under veiledning av professor Hege Christensen og professor Anders Åsberg. Arbeidet ble påbegynt i august 2013 og avsluttet mai 2014.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til Hege Christensen og stipendiat Ida Robertsen. Takk til Hege for at du alltid tar deg tid i en travel hverdag. Du har alltid godt humør og gode råd å komme med. Takk for konstruktive tilbakemeldinger i skriveprosessen og god hjelp hele veien, og spesielt nå på slutten. Takk til Ida for opplæring på lab, alle gode diskusjoner og deling av frustrasjon. Du har lært meg utrolig mye, og har alltid stilt opp hvis jeg har lurt på eller trengt hjelp til noe, selv om du selv har hatt mye å gjøre. Du er fantastisk!

Takk til Anders Åsberg for gode faglige innspill og råd, samt all praktisk hjelp med anskaffelse av pasientprøver. Videre vil jeg takke Siri, Hilde og Camilla for hjelp med blodprøvetaking, samt alle blodgiverne som har bidratt med forskningsmateriale.

Takk til resten av farmakokinetikk-gruppa for tirsdagsmøter, diskusjoner og kaffepauser. En stor takk til alle i 4. etasje for et inkluderende og hyggelig arbeidsmiljø med felles lunsj og kakefredag. En spesiell takk til alle medstudentene på masterkontoret for faglige og mindre faglige diskusjoner, matpauser, andre pauser og mye latter. Dere har alle bidratt til at dette har vært et supert år!

Til slutt vil jeg takke familie og venner for all støtte og oppmuntring gjennom hele mastergradsarbeidet. En spesiell takk til Thomas for korrekturlesing på slutten, for at du har lagt ned så mye tid i jakten på leilighet og for at du alltid er der for meg.

Alt i alt har dette vært et spennende, lærerikt, utfordrende, givende og morsomt år som jeg aldri ville vært foruten.

Oslo, 15. mai 2014

Kathrine Ahlsen



# Forkortelser

ABCB1	ATP-bindende kassett-transportør B1
ABC-transportører	ATP-bindende kassett-transportører
ADME	Administrasjon, distribusjon, metabolisme, eliminasjon
ADP	Adenosindifosfat
ATP	Adenosintrifosfat
CAN	Kronisk allograft nefropati
C-motif	C-linker regionen
CNI	Kalsineurinhemmer
CPT	Cell Preparation Tube
CV	Variasjonskoeffisient
CYP	Cytokrom P-450
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DNR	Daunorubicin
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
FDA	Food and Drug Administration
FCS	Fetalt kalveserum
GLP	God laboratoriepraksis
HIV	Humant immunsviktvirus
KOLS	Kronisk obstruktiv lungesykdom
MDR	Multidrug resistant
MDR1	Multidrug resistant protein 1
MRP	Multidrug resistance-related protein
NBD	Nukleotidbindende domene
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NSFT	Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi
PBMC	Perifere mononukleære blodceller
PBS	Fosfatbufret fysiologisk saltvann
P-gp	P-glykoprotein
REK	Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk

RPMI	Roswll Park Memorial Institute
SD	Relativt standardavvik
SLC	Solute Carrier Transporters
SLE	Systemisk lupus erythematosus
SNP	Singel nukleotid polymorfisme
SPSS	Statistical Package for the Sosial Sciences
TDM	Terapeutisk legemiddelmonitorering
TMD	Transmembrant domene
YB-1	Y-boks-bindende protein-1
Å	Ångstrøm

# Abstract

## Background

P-glycoprotein (P-gp), an adenosine triphosphate (ATP)-dependent efflux pump, protects cells and tissues in the body against foreign substances. P-gp is expressed not only in the body's many surfaces, such as the intestine and the blood-brain barrier, but also in lymphocytes. Lymphocytes are the site of action for the immunosuppressive drugs ciclosporin and tacrolimus. They are substrates for P-gp, and it is therefore conceivable that the activity of the transporter may be involved in the regulation of the intracellular concentration and effect of these drugs. A high activity of P-gp in lymphocytes will inhibit the distribution of the drugs to their target and may therefore lead to resistance and higher risk for acute rejections.

## Aim

The purpose of this master thesis was to develop and validate an *ex vivo* method for determination of P-gp activity in lymphocytes from organ transplanted recipients.

## Method

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated (from healthy volunteers and organ transplant recipients) by density centrifugation with Leucosep tubes. The isolated cells were incubated with rhodamine123 in a Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium for 30 minutes (37 °C). PBMCs were then washed twice with RPMI and 2% fetal calf serum, and incubated (60 minutes, 37 °C) with or without a selective inhibitor of P-gp (zosuquidar). PBMCs were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and 2% fetal calf serum, and rhodamine123 fluorescence was immediately measured on Victor<sup>TM</sup>. P-gp activity was determined by calculating a ratio for rhodamine123 fluorescence with or without zosuquidar in three parallels.

## Results

Preliminary experiments showed large intra- and interday variability on fresh isolated PBMCs. Following parameters were examined during the development and optimization process; Type of tube used in the isolation of PBMCs, the number of washing steps and degree of deceleration during centrifugation. Centrifugation speed and concentration of the P-gp inhibitor zosuquidar were factors that had relevant influence on the activity measurements.

The final method showed satisfactory intra- and interday variability with coefficient of variation below respectively 20% and 15%. Ratios for P-gp activity from 1.1 to 1.6 were determined for four different individuals, which probably reflect normal biologic variation between individuals. Renal transplant recipients showed a P-gp activity from 1.3 to 2.0.

### **Conclusion**

A method for measuring P-gp activity in PBMCs has been developed and optimized. The method shows satisfactory inter- and intraday variability and has been applied on a relevant patient population.

# Sammendrag

## Bakgrunn

P-glykoprotein (P-gp), en adenosintrifosfat (ATP)-avhengig efflukspumpe, beskytter celler og vev i kroppen mot fremmedstoffer. P-gp er ikke bare lokalisert i kroppens mange overflater, som i tarmen og i blod-hjerne-barrieren, men også i lymfocytter. Immunsuppressive legemidler som ciklosporin og takrolimus har sitt virkested intracellulært i lymfocytter. De er substrater for P-gp, og det kan derfor tenkes at aktiviteten av denne pumpen kan være involvert i reguleringen av den intracellulære eksponeringen, og dermed også effekten av disse legemidlene. En høy aktivitet av P-gp i lymfocytene vil motvirke distribusjonen av disse legemidlene til det intracellulære målmolekylet, og kan dermed føre til behandlingsresistens og økt fare for rejeksjoner.

## Hensikt

Hensikten med dette arbeidet var å utvikle og validere en *ex vivo* metode for bestemmelse av P-gp aktivitet i lymfocytter fra transplanterte pasienter.

## Metode

Humane perifere mononukleære blodceller (PBMC) ble isolert fra perifert fullblod (fra friske frivillige og organtransplanterte pasienter) ved tetthetsgradient-sentrifugering med Leucosep-rør. De isolerte cellene ble inkubert med det fluoriserende P-gp substratet rhodamin123 i et Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-medium i 30 minutter ved 37°C. Cellene ble så vasket to ganger med RPMI og 2% fetalt kalveserum (FCS), og deretter inkubert (60 minutter, 37°C) med eller uten en selektiv hemmer av P-gp (zosuquidar). Deretter ble cellene vasket med fosfatbufret fysiologisk saltvann (PBS) og 2% FCS, før fluorescens ble målt på en mikroplateleser (Victor™). P-gp aktivitet ble bestemt ved å beregne ratio av rhodamin123-fluorescens med og uten zosuquidar med tre paralleller.

## Resultater

Innledende forsøk viste stor intra- og interdag variasjon på ferskt isolerte PBMC. Under metodeutviklings- og optimaliseringsprosessen ble følgende parametere undersøkt; type rør brukt til isolering av lymfocytter, antall vaskerunder og grad av retardasjon ved sentrifugering av PBMC. Sentrifugeringshastighet og konsentrasjon av P-gp hemmeren zosuquidar var de faktorene som hadde relevant innflytelse på aktivitetsmålingen. Endelig

metode viser tilfredsstillende intradag- og interdag-variasjon, med variasjonskoeffisienter under henholdsvis 20% og 15%. Ratioer fra 1,1 til 1,6 er blitt bestemt for 4 ulike forsøkspersoner, noe som sannsynligvis reflekterer normal biologisk variabilitet i P-gp aktivitet mellom individene. Nyretransplanterte pasienter viste en P-gp aktivitet fra 1,3 til 2,0.

### **Konklusjon**

Det er utviklet og optimalisert en metode til måling av P-gp aktivitet i PBMC med tilfredsstillende inter- og intradag variabilitet. Metoden er applisert på den relevante pasientpopulasjonen med tilfredsstillende resultater.

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Innledning.....</b>	<b>1</b>
1.1	Interindividuell variasjon i legemiddelrespons.....	1
1.1.1	Farmakodynamisk variabilitet.....	1
1.1.2	Farmakokinetisk variabilitet.....	1
1.2	Transportører.....	3
1.2.1	P-glykoprotein.....	4
1.3	Variabilitet i P-gp.....	9
1.4	P-gp og organtransplantasjon.....	10
1.5	Rhodamin123-effluksmetoden.....	12
<b>2</b>	<b>Hensikten med oppgaven .....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Materialer og metode.....</b>	<b>15</b>
3.1	Kjemikalier .....	15
3.2	Utstyr.....	15
3.3	Løsninger.....	16
3.4	Friske personer .....	18
3.5	Pasientmateriale.....	18
3.6	Opprinnelig metode .....	19
3.6.1	Isolering av lymfocytter .....	19
3.6.2	Celletelling.....	20
3.6.3	Preparering av cellepellet.....	20
3.6.4	Tining av celler .....	20
3.6.5	Celletelling og recovery .....	20
3.6.6	Aktivitet av P-gp – Rhodamin123-effluksmetoden .....	21
3.7	Optimalisering av metoden .....	22
3.7.1	Isolering av lymfocytter .....	22
3.7.2	Celletelling.....	22
3.7.3	Preparering av cellepellet/Tining av celler/Celletelling og recovery .....	23
3.7.4	Aktivitet av P-gp – Rhodamin123-effluksmetoden .....	23
3.8	Endelig metode .....	24
3.8.1	Isolering av lymfocytter .....	24
3.8.2	Celletelling.....	24
3.8.3	Aktivitet av P-gp – Rhodamin123-effluksmetoden .....	24
3.9	Databearbeidelse.....	26
3.10	Validering.....	26
3.11	Statistikk .....	26
<b>4</b>	<b>Resultater.....</b>	<b>27</b>
4.1	Metodeoptimaliseringen.....	27
4.1.1	Isolering av lymfocytter .....	27
4.1.2	Celletelling.....	27
4.1.3	Aktivitet av P-gp – Rhodamin123-effluksmetoden .....	28
4.2	Validering av metoden .....	31
4.2.1	Intradag-variasjon .....	31
4.2.2	Interdag-variasjon .....	33
4.3	Resultater pasienter .....	34
4.3.1	Intradag-variasjon .....	34
4.3.2	Aktivitet av P-gp .....	35

<b>5</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>36</b>
5.1	Metodeoptimaliseringen.....	36
5.2	Resultatevaluering.....	38
5.3	Klinisk nytteverdi.....	40
<b>6</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>42</b>
	<b>Litteraturliste .....</b>	<b>43</b>
	<b>Appendiks .....</b>	<b>48</b>
	Appendiks A: Laboratorie-protokoll.....	48
	Appendiks B: Poster.....	51



# 1 Innledning

## 1.1 Interindividuell variasjon i legemiddelrespons

Variabilitet mellom individer med fokus på legemiddelrespons er velkjent. Samme dose gitt til ulike individer kan gi variabilitet i form av mangel på effekt hos enkelte individer, og god effekt eller uønskede effekter hos andre. Variabiliteten kan skyldes biologiske og fysiologiske faktorer (kjønn, alder, sykdomsbilde), miljøfaktorer (røyking), legemiddelinteraksjoner og genetiske faktorer. Det er estimert at 20-95% av variabiliteten kan forklares ut fra genetiske faktorer [1]. De ulike årsakene til variabilitet fører til variasjon i legemidlers farmakodynamikk og farmakokinetikk som kan gi ulik legemiddelrespons, noe som påpeker nødvendigheten av en mer individualisert behandling. Pasientens innstilling til behandlingen kan også være av betydning i form av tro på at behandling gir effekt (placebo) og ingen tro på effekt (nocebo) [1-3] .

### 1.1.1 Farmakodynamisk variabilitet

Farmakodynamikk beskriver den farmakologiske effekten et legemiddel har i kroppen, og den kan være både ønsket og uønsket. Årsaken til variabilitet i farmakodynamikk skyldes både genetiske og ikke-genetiske faktorer. Hovedårsaken til variabilitet i farmakodynamikk skyldes genetiske variasjoner hos molekylerne (reseptorer, enzymer, proteiner) involvert i effekten av legemidlene [4]. Eksempler på målmolekyler med kjente genetiske polymorfismer er dopaminreseptorer, serotoninreseptorer,  $\beta_2$ -adrenerge reseptorer, opioidreseptorer og angiotensinkonverterende enzym. Forventning og tro på behandling, sykdom, annen legemiddelbehandling og livsstil er eksempler på psykologiske, patologiske og miljømessige faktorer som er ikke-genetiske [5].

### 1.1.2 Farmakokinetisk variabilitet

Farmakokinetikk er læren om forholdet mellom legemiddelinntak og konsentrasjon av legemiddel i kroppen over tid [2]. Sentrale prosesser i farmakokinetikken er absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon (ADME) [6]. Faktorer assosiert med farmakokinetisk variabilitet er vekt, alder, organfunksjon, sykdomstilstand, proteinbinding og aktivitet av metaboliserende enzymer og transportproteiner. Variabilitet i proteinuttrykk og aktivitet av transportører og enzymer kan bli bestemt av genetiske eller miljømessige faktorer.

Koadministrasjon med andre legemidler som benytter de samme enzymene og/eller transportproteinene kan også føre til ulik farmakologisk effekt [2].

Absorpsjon av legemidler påvirkes av legemiddelets tid i magesekken og tarmmotilitet. Dette gir variasjon både mellom individer, og hos samme individ ved ulike anledninger [5]. Matinntak kan også påvirke absorpsjon av legemidler. Avhengig av måltidets størrelse og legemiddelets fysikalsk-kjemiske egenskaper kan den orale absorpsjonen reduseres, forsinkes, akselereres, økes eller forbli uforandret ved samtidig matinntak [7, 8].

Lever og nyre er de to viktigste organene ansvarlige for eliminasjon av legemidler og metabolitter [9]. Adekvat nyrefunksjon er viktig for eliminasjon av flere legemidler. Redusert nyrefunksjon skyldes endring i glomerulær blodstrøm og filtrasjon, tubulær sekresjon og tubulær reabsorpsjon, og fører til nedsatt eliminasjon av legemidler. Vevsdistribusjon av legemiddel kan også bli endret ved nedsatt nyrefunksjon grunnet lavere proteinbindingsgrad [10, 11]. Leveren har en sentral rolle i farmakokinetikken til mange legemidler. Metabolisme, blodstrøm til lever, binding til plasmaproteiner og utskillelse via galle vil alle ha en innvirkning på et legemiddels farmakokinetikk, og er avhengig av en normal leverfunksjon. Nedsatt eliminasjon via lever vil kunne føre til økt halveringstid og akkumulasjon av legemiddel og metabolitter, med fare for toksiske effekter [12].

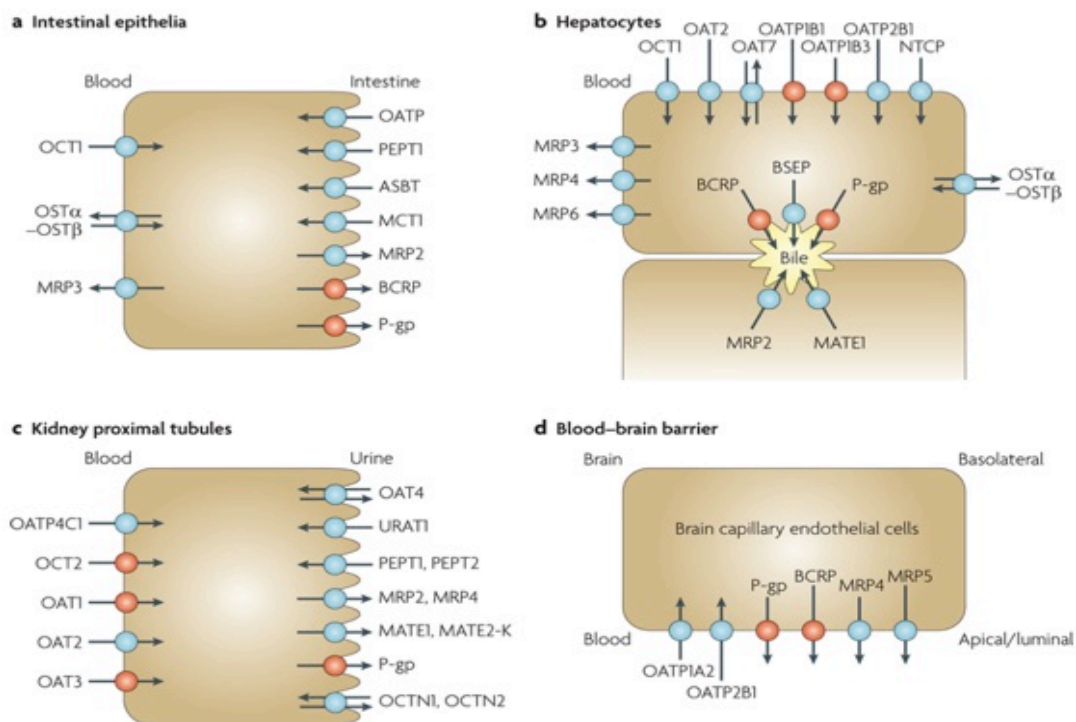
Legemiddelmetaboliserende enzymer i tarm og lever påvirker absorpsjon og biotilgjengelighet av legemidler. Metabolisme av legemidler skjer ved fase I og fase II metabolisme, og cytokrom P450 (CYP)-enzymssystemet er det viktigste enzymssystemet for fase I metabolisme. Fase I metabolisme introduserer funksjonelle grupper ved oksidasjon, reduksjon eller hydrolyse, og gjør legemiddelet klart for fase II metabolisme. Fase II metabolisme konjugerer substratene til mer vannløselige metabolitter som skilles ut av kroppen [6]. Polymorfismer i CYP-enzymene og miljømessige faktorer som røyk, mat og andre legemidler kan påvirke enzymenes evne til metabolisme og dermed også biotilgjengelighet og effekt av legemidler [6, 13].

For å nå virkestedet og utøve sin farmakologiske effekt blir de fleste legemidler transportert fra den systemiske sirkulasjonen og over biologiske membraner. Membranene krysses enten ved passiv diffusjon eller aktiv transport ved hjelp av transportører. Den intracellulære legemiddelkonsentrasjonen bestemmes av forskjellen mellom innfluks og effluks av

legemiddel [14]. Transportørenes koordinerte uttrykk og aktivitet bestemmer mengden og retningen på legemidlenes bevegelse i store organsystemer som tarm, lever og nyre. Modifisering av en transportørs uttrykk og funksjon ved genetiske og miljømessige faktorer vil dermed kunne påvirke absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon av legemidler [15].

## 1.2 Transportører

Membrantransportører er store membranassosierte proteiner som er involvert i transporten av substanser over biologiske membraner (figur 1). De kontrollerer influks av ioner, essensielle næringsstoffer, legemidler og endogene substanser i vev, og effluks av legemidler, andre xenobiotika, cellulært avfall og toksiner [6]. Transportørene spiller en viktig rolle i reguleringen av systemiske og intracellulære legemiddelkonsentrasjoner, og som beskyttende barrierer i flere organer og celletyper ved å kontrollere absorpsjon, distribusjon og eliminasjon. For legemidler kan transportørene bidra til både terapeutisk effekt og uønskede effekter. Transportørene deles inn i flere superfamilier, der solute carrier transportør (SLC)-superfamilien og adenosintrifosfat (ATP)-bindende kassett-superfamilien (ABC-transportører) er de to største [16]. Transporten kan foregå med (aktiv) og uten (passiv) energi [6]



**Figur 1. Oversikt over utvalgte humane transportører.** Utvalgte humane transportører i plasmamembranen i tarmepitel, hepatocytter, nyretubuli og blod-hjerne-barrieren. Figur fra Giacomini KM. et al. [16].

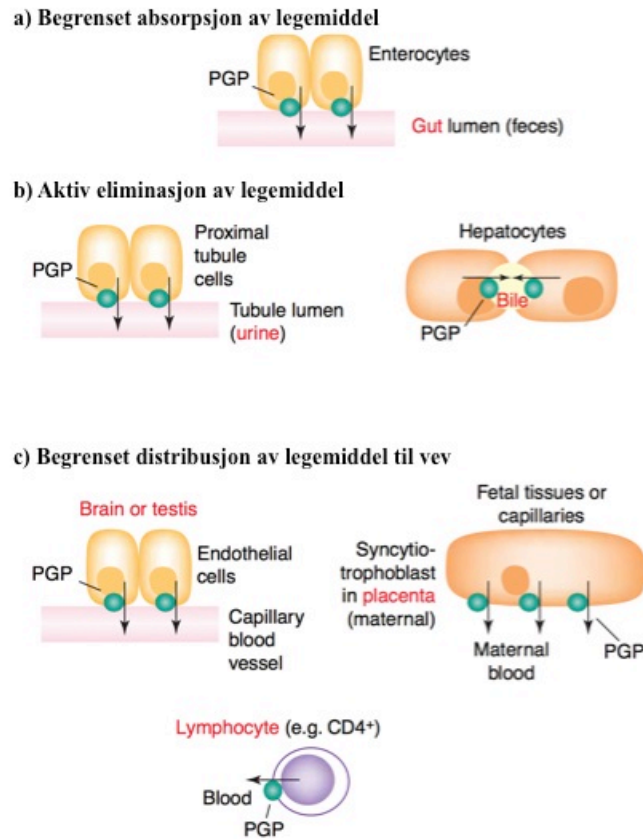
ABC-transportørene er en av de viktigste superfamiliene involvert i distribusjonen av legemidler [16]. De fleste transportørene i denne familien er aktive og bruker ATP som energikilde for å pumpe substrater over membraner [6]. Proteiner blir klassifisert som ABC-transportører basert på deres ATP-bindende domener, også kalt nukleotidbindende domener. Det finnes både halvtransportører og fulltransportører. Fulltransportørene inneholder fire domener, to nukleotidbindende domener og to transmembrane domener, mens halvtransportørene inneholder en av hvert domene. Halvtransportørene går sammen som homo- eller heterodimerer for å danne en funksjonell transportør [17]. De nukleotidbindende domenene binder og hydrolyserer ATP, som genererer energi til den aktive transporten av substrater over membranen. De hydrofobe transmembrane domenene danner transportkanalen for substratene gjennom cellemembranen [18]. Det finnes 49 kjente gener som koder for ABC-proteiner, og disse er delt inn i 7 underklasser, *ABCA* til *ABCG*. Den mest kjente er ATP-bindende kassett-transportør B-1 (*ABCB1*) som koder for P-glykoprotein (P-gp) [6].

### 1.2.1 P-glykoprotein

P-gp er den mest studerte transportøren, og den ble først beskrevet av Juliano og Ling i 1976 som en viktig multidrug resistent (MDR) mekanisme i kreftbehandling [19]. Proteinets er en transmembran effluxpumpe som er kodet for av *ABCB1*, og er også kjent ved navnet multidrug resistent protein 1 (MDR1) [20, 21].

#### Uttrykk og distribusjon

P-gp uttrykkes i flere celletyper og vev, blant annet nyrer, lever, tarm, pankreas og binyrer. Transportøren uttrykkes og distribueres i membraner på den siden av cellen som vender mot lumen i enterocytter i tynntarm, i prokismale tubulære celler i nyrene og i gallegangen. P-gp uttrykkes også i hepatocytter i lever, endotelceller i blod-hjerne-barrieren, i andre blod-vevs barrierer og i ulike celler involvert i immunresponsen [22-24]. Grunnet proteinets transportfunksjon pumpes endogene og eksogene substanser (inkludert legemidler), metabolitter og toksiner ut i urin, galle og feces (figur 2). På den måten bidrar P-gp til beskyttelse av cellene og transport av cellulært avfall [25]. I blod-vevs barrierer, som blod-hjerne barrieren, blod-testis barrieren og blod-placenta barrieren, spiller P-gp en viktig rolle i å begrense distribusjon av enkelte molekyler til vevene [24, 26].

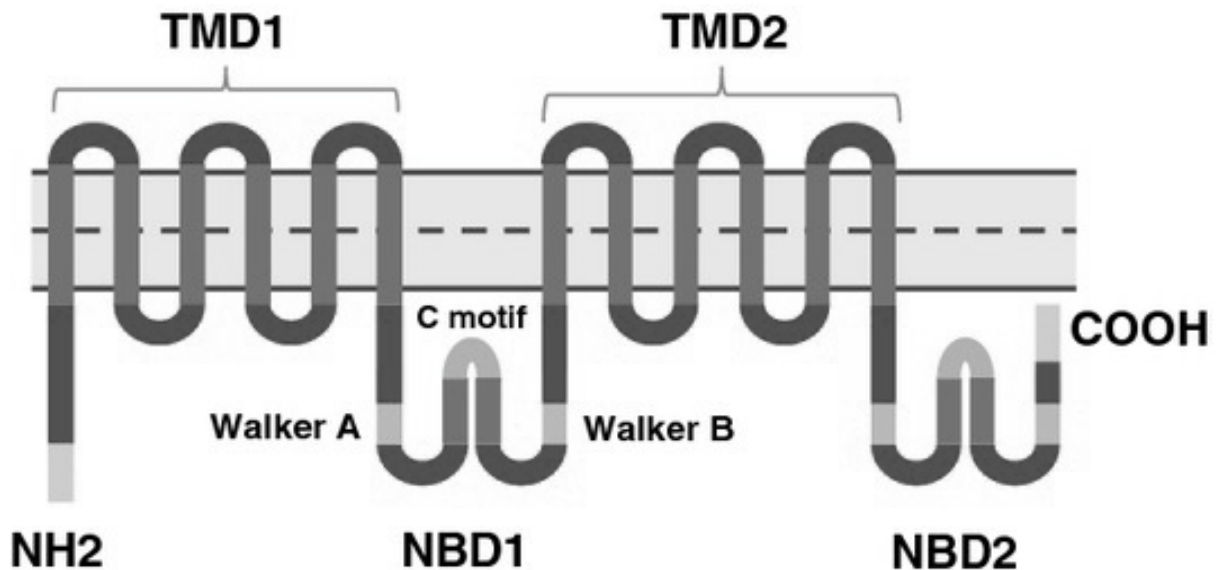


**Figur 2. Uttrykk og funksjon av P-gp i ulike vev.** (a) P-gp begrenser absorpsjon av legemiddel etter oral administrasjon grunnet uttrykk i enterocytter i tynntarm. (b) P-gp bidrar til eliminasjon av legemiddel via urin og galle grunnet sitt uttrykk i nyre og lever. (c) P-gp begrenser distribusjon av legemiddel til sensitive vev (hjerne, testikler og placenta) og lymfocytter. Modifisert fra Fromm, MS. [26].

## Struktur og funksjon

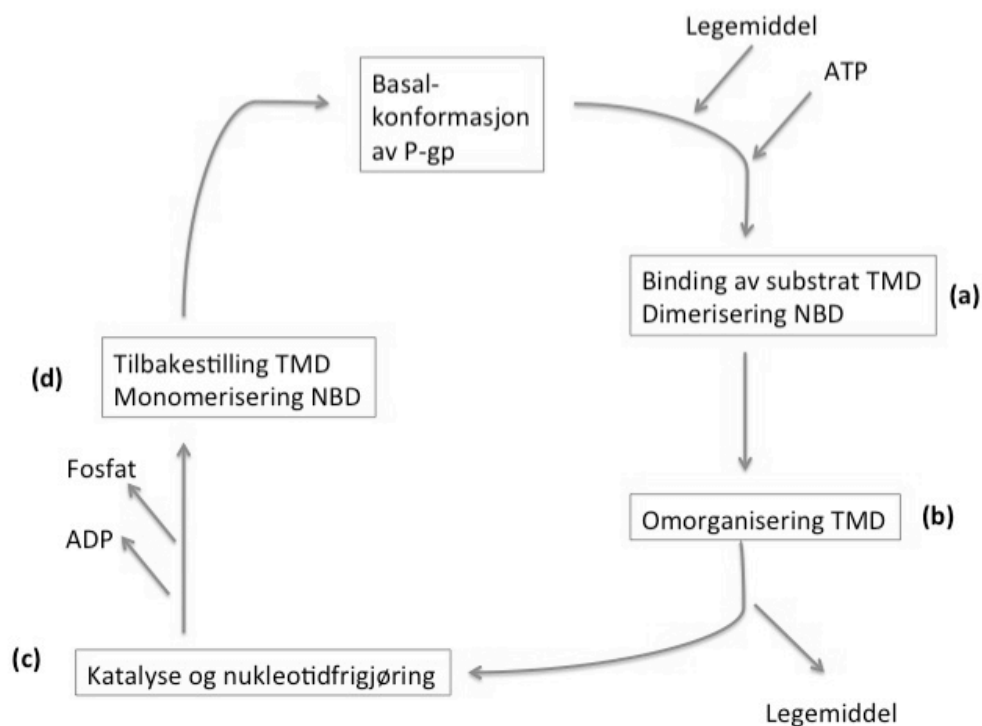
P-gp består av 1276-1280 aminosyrer med en molekylær masse på omtrent 170 kDa [27]. Proteinets syntetiseres som et 140 kDa protein og modnes ved N-glykosylering til et 170 kDa glykoprotein [28]. P-gp har to strukturelt identiske halvdelar og er en fulltransportør (figur 3). Den inneholder to nukleotidbindende domener og to transmembrane domener. Hver av de to halvdelene består av seks transmembrane domener etterfulgt av et intracellulært nukleotidbindende domene [17, 25]. NH<sub>2</sub>- og COOH-endene er lokalisert intracellulært [27]. De nukleotidbindende domenene består av tre regioner, Walker A, Walker B og C-linker regionen (C-motif). Alle ATP-bindende proteiner inneholder Walker A og Walker B, mens C-linker regionen er spesifikk for ABC-transportører [17, 29]. Begge de nukleotidbindende domene er essensielle for funksjonen til transportøren da ATP bindes her og P-gp aktiviteten er avhengig av ATP. De ATP-bindende domenene fungerer som ATP-aser, som omdanner

ATP til adenosindifosfat (ADP), og generer energi så substrater kan pumpes over membranen [27]. De transmembrane domenene inneholder flere substratbindings seter [30].



**Figur 3. Strukturen til P-gp.** P-gp består av to strukturelt identiske halvdelene av et nukleotidbindende domene (NBD) og et transmembrant domene (TMD). Den første ekstracellulære sekvensen er N-glykosylert. NBD består av Walker A- og Walker B-regioner lokalisert intracellulært. Halvdelene er sammenkoblet ved en C-linker-region (C-motif), som er spesifikk for ABC-transportører. Modifisert fra Panagiotopoulou V et.al. [29].

Effluks av legemiddel over plasmamembranen ved P-gp er en kompleks og ATP-avhengig prosess som involverer kommunikasjon mellom flere bindings seter, og de nukleotidbindende domenene. Transportørens basalkonfigurasjon innehar høyaffinitetsbindings seter i de transmembrane domenene rettet intracellulært, og de nukleotidbindende domene er i en åpen konfigurasjon. Høyaffinitetsbindings setene promoterer legemiddelassosiering som igangsetter kommunikasjon mellom de transmembrane domene og de nukleotidbindende domenene (figur 4) [31]. Okkupasjon av bindings setene induserer en konformasjonsendring hos transportøren, som forsterkes ytterligere ved binding av ATP til de nukleotidbindende domenene [32]. For å kunne generere en effektiv transport av substrater over cellemembranen må høyaffinitetsbindings setene inne i cellen omdannes til lavaffinitetsbindings seter ekstracellulært, så substratet kan frigjøres. Etter substratfrigjøring hydrolyseres ATP, og ADP og fosfat frigjøres. Dette gir nye konformasjonsendringer og transportøren tilbakestilles til sin basalkonformasjon [31].



**Figur 4. Oversikt over transportmekanisme for P-gp.** Effluksen av legemiddel ved P-gp består av flere trinn. (a) Binding av legemiddel til transportør, og de nukleotidbindende domene (NBD) dimeriserer. (b) Omorganisering av de transmembrane domene (TMD) så bindingssetene endres fra høy til lav affinitet, og legemiddel frigjøres på motsatt side av membranen. (c) ATP hydrolyserer og frigjøres fra de nukleotidbindende domene. (d) Den nukleotidbindende dimeren brytes og de transmembrane domene reorienteres til basalkonformasjonen. Modifisert fra Callaghan R et.al. [31].

### Substrater, indusere og hemmere

P-gp medierer effluks av mange strukturelt ulike forbindelser [33]. Substratene varierer i størrelse, struktur og funksjonalitet fra små molekyler, som organiske kationer, karbohydrater, aminosyrer og antibiotika til store makromolekyler som polysakkarider og proteiner [27]. De fleste av substratene inneholder to eller tre elektrondonorgrupper med en avstand på henholdsvis 2,5 Å og 4,6 Å. Økt antall elektrondonorgrupper gir økt affinitet for assosiasjon med P-gp [34]. Flere ulike legemiddelgrupper er representert som substrater, inhibitorer og indusere av P-gp (tabell 1) [35]. Mange av substratene til P-gp har også overlappende substratspesifisitet for CYP3A4, men denne er ikke absolutt [26].

**Tabell 1: Oversikt over Substrater, hemmere og indukere av P-gp.** Modifisert fra Zhou SF et al. og Kim RB [27, 35]

<b>Substrater</b>	<b>Inhibitorer</b>	<b>Indusere</b>
Amitriptylin	Amiodaron	Amiodaron
Ciklosporin	Atorvastatin	Bromokriptin
Deksametason	Bromokriptin	Deksametason
Digoksin	Ciklosporin	Doxorubicin
Diltiazem	Diltiazem	Erytromycin
Docetaxel	Erytromycin	Etoposid
Doxorubicin	Fluoxetin	Fenobarbital
Erytromycin	Ketokonazol	Fenytoin
Etoposid	Progesteron	Indinavir
Fenobarbital	Ritonavir	Insulin
Fenytoin	Takrolimus	Johannesurt
Imatinib	Vinblastin	Metotreksat
Indinavir	Zosuquidar	Morfin
Irinotekan		Nifedipin
Ketokonazol		Rifampicin
Kortisol		Ritonavir
Loperamid		Takrolimus
Losartan		Vinkristin
Metylprednisolon		
Morfin		
Ranitidin		
Rhodamine 123		
Rifampicin		
Ritonavir		
Sakinavir		
Sirolimus		
Takrolimus		
Tetracyclin		
Verapamil		
Vinblastin		
Vinkristin		



## 1.3 Variabilitet i P-gp

Variabilitet i uttrykk og aktivitet av P-gp kan skyldes genetikk og andre faktorer som sykdomstilstand og samtidig bruk av andre legemidler [36].

Flere singel nukleotid polymorfismer (SNP) har blitt beskrevet i genet som koder for P-gp. Det er gjort mange studier, men flere av disse er motsigende med hensyn på polymorfismenes effekt på MDR1 fenotype og farmakokinetikk for dets substrater [37]. 3435C>T mutasjonen er den mest studerte, og den har blitt assosiert med endret uttrykk og funksjon av MDR1 [38]. Noen studier har vist at dette har resultert i endret biotilgjengelighet av legemidler som er substrater for P-gp. Hitzl et al. viste at individer homozygot for C i 3435 posisjon har høyere effluks av rhodamin fra CD 56+ celler enn individer med TT genotypen [39]. En annen studie viste at *ABCB1* 3435CC genotypen er assosiert med høyere P-gp aktivitet sammenlignet med 3435TT genotypen for transport av takrolimus [40]. For digoksin har Sakaeda et al. vist at serumkonsentrasjonen var lavere i TT homozygote enn hos CC homozygote, mens Kurata et al. har vist det motsatte [41, 42]. SNP'ene 1236C>T og 2677 G>T/A er også beskrevet i litteraturen. 1236C>T og 3435C>T er synonyme SNP, mens 2677G>T/A fører til en aminosyresubstitusjon. Disse tre er avhengige av hverandre og ser ut til å opptre som to kombinasjoner av alleler (haplotyper), *ABCB1*\*1 (1236C-2677G-3435C) og *ABCB1*\*13 (1236T-2677T-3435T) [43].

Sykdomstilstander som involverer cytokiner påvirker legemidlers farmakokinetikk ved å regulere uttrykk og aktivitet av enzymer og transportører. Endring av P-gp aktivitet ved inflammatoriske tilstander kan ha både positive og negative innvirkninger avhengig av sykdommen og legemiddelet som påvirkes [36]. Mange studier har vist en nedregulering av P-gp ved inflammasjon, men en studie har vist positiv korrelasjon mellom sykdomsaktivitet og P-gp uttrykk ved systemisk lupus erythematosus (SLE) [36, 44]. En oppregulering av P-gp i perifere mononukleære blodceller (PBMC) er vist ved flere sykdommer, blant annet kreft, humant immunsviktvirus (HIV), reumatoid artritt, kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) og ved organtransplantasjon [45-49]. MDR1 blir induert av flere cytotoksiske stimuli og transkripsjon av *ABCB1* blir direkte regulert av transkripsjonsfaktoren humant Y-boks-bindende protein-1 (YB-1). Interleukin (IL)-2 er en del av patogenesen ved autoimmune sykdommer og aktiverer lymfocytter. Trolig induserer den også YB-1, som igjen gir økt P-gp uttrykk i lymfocytter og kan bidra til P-glykoprotein-mediert resistens [50]. Ved bruk av

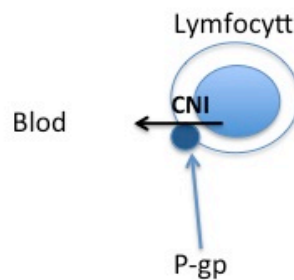
legemidler som er substrater for P-gp, kan en oppregulering av transportøren føre til reduserte nivåer av legemiddel på virkestedet. Dette gir utfordringer knyttet til legemiddelbehandling med substrater som har sitt virkested intracellulært i lymfocytter, som immunsuppressiva [36].

Legemiddelinteraksjoner er en kilde til individuelle forskjeller i P-gp kapasitet for bestemte legemiddelsubstrater. Interagerende substrater kan både indusere og hemme aktiviteten av P-gp, og dermed føre til endret systemisk eksponering ved endret opptak og eliminasjon av flere legemidler. Det kan også føre til endret lokal eksponering i sentralnervesystemet via blod-hjerne-barrieren, og i andre vev som uttrykker P-gp [51]. Grunnet sine mange substrater, indusere og hemmere (tabell 1) vil sjansen for klinisk relevante interaksjoner med andre legemidler være tilstede.

## **1.4 P-gp og organtransplantasjon**

Kombinasjonsterapi med kalsineurinhemmer (CNI) (takrolimus eller ciklosporin), nukleidsyntese-hemmer (mykofenolat mofetil) og glukokortikoider er den mest brukte immunsuppressive behandlingen etter organtransplantasjon. Tilleggsadministrasjon av et terapeutisk antistoff på transplantasjonstidspunktet blir også stadig mer vanlig [52]. Ciklosporin og takrolimus har sitt virkested intracellulært i lymfocytter, der de hemmer kalsineurin. Ved å hemme kalsineurin hemmes defosforylering og translokasjon av NFAT ("nuclear factor of activated T-cells") til cellekjernen, og dermed også transkripsjonen av IL-2 som er viktig for proliferasjon og aktivering av T-lymfocytter [53]. Takrolimus og ciklosporin har smale terapeutiske vinduer og store intra- og interindividuelle variasjoner i effekt. Terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM) for optimalisering av dose er dermed nødvendig [54]. Monitorering av immundepende legemidler har gitt en kraftig reduksjon i antall rejeksjonsepisoder, men likevel opplever et relevant antall akutte reaksjoner av transplantert organ [55, 56].

P-gp pumper kalsineurinhemmerne ut av det intracellulære rom (figur 5). På grunn av dette kan aktiviteten av P-gp påvirke den intracellulære konsentrasjonen, og interindividuell variabilitet i P-gp aktivitet kan påvirke den immunsuppressive effekten [40].



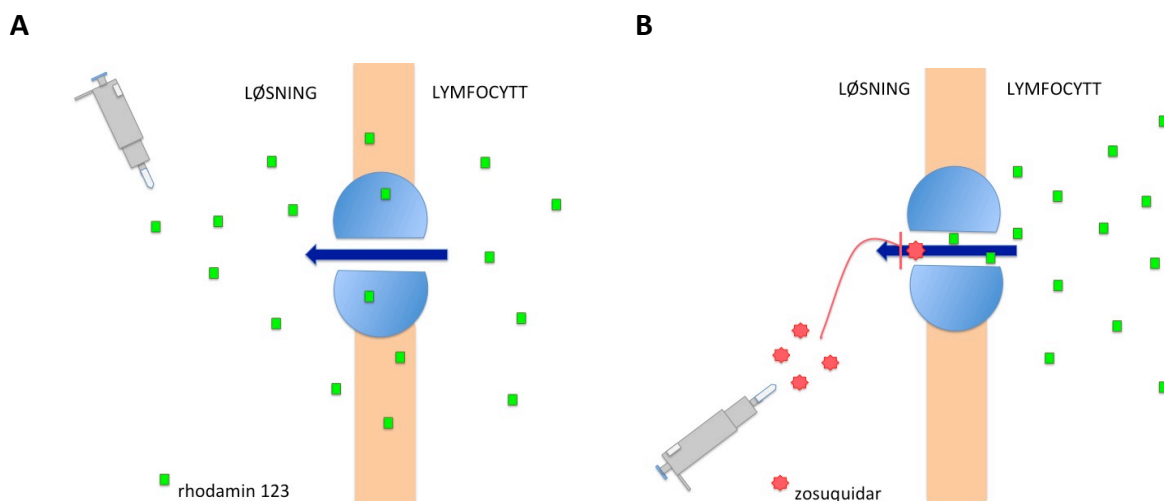
**Figur 5. P-gp og kalsineurinhemmere (CNI).** P-gp pumper CNI ut av lymfocytter til blodet. Modifisert fra Fromm, MS. [26].

En oppregulering av P-gp har blitt vist hos pasienter med akutte reaksjonsepisoder, noe som i teorien kan resultere i lavere intracellulære konsentrasjoner av immunsuppressiva (for eksempel ciklosporin og takrolimus), lavere immunsuppressiv aktivitet og fare for reaksjon [57]. Ved TDM måles konsentrasjon av legemiddel i fullblod. Flere studier har imidlertid vist at det er lite eller ingen korrelasjon mellom konsentrasjon på virkestedet (i PBMC) og konsentrasjon i fullblod. Falck et al. målte lave intracellulære konsentrasjoner av ciklosporin i T-lymfocytter tre dager før en reaksjonsepisode kunne oppdages klinisk. Nyretransplanterte som opplevde reaksjon hadde generelt lavere intracellulær konsentrasjoner av ciklosporin [58]. Lemaitre et al. fant ingen korrelasjon mellom intracellulære konsentrasjoner av takrolimus i PBMC og fullblod [56].

Aktiviteten av P-gp kan i tillegg til å påvirke immunsuppressiv effekt også påvirke vevskonsentrasjon og dermed også potensiell toksisitet assosiert med disse legemidlene. Det har blitt foreslått at den interindividuelle variabiliteten i P-gp uttrykk i nyretubulicellene kan bidra til økt lokal sensitivitet for CNI nefrotoksitet [53]. Assosiasjonen mellom P-gp uttrykk og CNI nefrotoksitet kan forklares ved akkumulering av CNI når apikalt P-gp uttrykk (og dermed aktivitet) er lavt [53]. En studie gjort av Naesens et al. viste at lavere P-gp uttrykk i nyrebiopsier fra transplanterte var en risikofaktor for kronisk histologisk skade hos pasienter som bruker takrolimus, men dette diskuteres i litteraturen [59-61].

## 1.5 Rhodamin123-effluksmetoden

Rhodamin123 og andre stoffer som avgir fluorescens kan brukes for å kategorisere aktiviteten av P-gp. Rhodamin123 diffunderer passivt over cellemembranen, men blir aktivt pumpet ut igjen av P-gp (figur 6A) [62]. Ved å bruke hemmere av P-gp (ciklosporin, takrolimus, zosuquidar), blokkeres P-gp-mediert effluks av rhodamin123. Dette fører til akkumulering av rhodamin123 i cellene, og den økte intracellulære konsentrasjonen reflekteres i form av økt fluorescensintensitet (figur 6B) [62].



**Figur 6. Illustrasjon av Rhodamin123-effluksmetoden.** A: Rhodamin123 diffunderer passivt over membranen og pumpes aktivt ut av P-gp. B: Zosuquidar hemmer P-gp og rhodamin123 forblir inne i cellen.

Den funksjonelle aktiviteten av P-gp kan beregnes ved å måle fluorescens av rhodamin123 ved tilstedeværelse og fravær av P-gp hemmer. Aktiviteten blir bestemt ved å beregne en ratio for forskjell i fluorescens med og uten hemmer [63]. Det benyttes ofte flere paralleller for med og uten hemmer, og det regnes ut en gjennomsnittsfluorescens. Ratioen for P-gp aktivitet regnes da ut som forskjell i gjennomsnittsfluorescens med og uten hemmer (ligning 1).

$$\text{Ratio for P-gp aktivitet} = \frac{\text{Fluorescens med hemmer}}{\text{Fluorescens uten hemmer}}$$

(Ligning 1)

Dersom det ikke er noen forskjell i fluorescens med og uten hemmer vil ratioen for P-gp aktivitet være 1,0. Dersom det er aktivitet av P-gp vil fluorescensen med hemmer være høyere enn fluorescensen uten hemmer, og ratioen vil bli høyere enn 1,0. Liten forskjell i fluorescens med og uten hemmer vil gi en ratio i nærheten av 1,0 og aktiviteten av P-gp vil være lav. Desto større forskjell i fluorescens for med og uten hemmer, desto høyere ratio.

## 2 Hensikten med oppgaven

På samme måte som P-gp er involvert i terapiresistens ved anvendelse av cytostatika er det mye som tyder på at økt P-gp aktivitet kan spille en rolle i forbindelse med immunsuppressive legemidlers effekt og toksisitet hos organtransplanterte pasienter. Hensikten med dette arbeidet var å utvikle og validere en *ex vivo* metode for bestemmelse av P-gp aktivitet i lymfocytter fra transplanterte pasienter. Metoden er planlagt å bli brukt for undersøkelse av transportørens rolle ved akutte reaksjoner og nyretoksisitet.

## 3 Materialer og metode

### 3.1 Kjemikalier

Tabell 2. Oversikt over kjemikalier.

Kjemikalium	Leverandør
Fosfatbufret saltvann (PBS)	Lonza, Verviers, Belgia
Dimetyl sulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	PAA Laboratories, Østerrike
RPMI 1640 uten fenolrødt	Gibco, NY, USA
Fetalt kalveserum (FCS)	PAA Laboratories, Østerrike
Rhodamin123	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.
Zosuquidar	Toronto Reserach Chemicals Inc., Canada
Tryptanblå 0,4 % oppløsning	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.

### 3.2 Utstyr

Tabell 3. Oversikt over utstyr.

Utstyr	Produsent
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)-rør, 6 mL	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Østerrike
Cell Preparation Tube (CPT)-rør, 8 mL	BD and company, Plymouth, UK
Blodprøvetappingsutstyr	Nål: BD and company, Plymouth, UK Holder: BD and company, Plymouth, UK
Sentrifugerør 50 mL	Corning Incorporated, NY, U.S.A.
Sentrifugerør 15 mL	Corning Incorporated, NY, U.S.A.
Leucosep-rør	Greiner Bio-One, North America Inc., Monroe, NC, U.S.A.
Plastpipetter (ikke-sterile)	VWR European, Kina
Falcon-rør (14 mL)	BD Biosciences, San Jose, California, U.S.A.
Sentrifuge (Heraeus Megafuge 16 R)	Thermo Fischer Scientific, Tyskland
Pipette-boy	IBS, Integra Biosciences

Stripette 10 mL (til pipetteboy)	Corning Incorporated, NY, U.S.A.
Automatisk celleteller	Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.
Mikroskop	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Bürker-kammer	Karl Hecht "Assistent" GmbH, Sveits
Pipetter	Sartorius BioHit, Helsinki, Finland
Pipettespisser	Sartorius BioHit, Helsinki, Finland
Cryo-rør	Thermo Fischer Scientific, Tyskland
Eppendorfrør (1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Eppendorfrør, protein LoBind (1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Vannbad	Julabo Labortechnik, GmbH, Tyskland
Bordsentrifuge (Heraeus Fresco 21)	Thermo Fischer Scientific, Tyskland
Mikroplateleser (Victor™)	Perkin Elmer, Finland
Plate til mikroplateleser	Corning Incorporated, NY, U.S.A.

### 3.3 Løsninger

**Tabell 4. Oversikt over tillaging av løsninger.**

Løsning	Tillaging
RPMI 1640 + 2% FCS	1 mL FCS tilsettes 50 mL rør og fylles opp med RPMI 1640.
PBS + 2% FCS	1 mL FCS tilsettes 50 mL rør og fylles opp med PBS.
Stock-løsning rhodamin123 1 mM	$M_w \text{ rhodamin123} = 380.83 \text{ g/mol}$ $1 \text{ mM} = 0.001 \text{ M}$ $0.001 \text{ M} \times 380.83 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.38 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ $= 0.38 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ $\frac{1.7 \text{ mg}}{X \text{ mL}} = 0.38 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ $X = 4.5 \text{ mL}$ <p>1.7 mg tørrstoff rhodamin123 løses i 4.5 mL MeOH</p>



10 $\mu\text{M}$ rhodamin123	100 $\mu\text{L}$ av 1 mM løsning overføres til eget rør og tilsettes 9,9 ml MeOH.
0,8 $\mu\text{M}$ rhodamin123	$10\ \mu\text{M} \times X\ \text{mL} = 0.8\ \mu\text{M} \times 2,5\ \text{mL}$ $X = 200\ \mu\text{L}$ <p>200 <math>\mu\text{L}</math> av 10 <math>\mu\text{M}</math> rhodamin123-løsning dampes av med nitrogen og reløses i 2,5 mL inkubasjonsmedium.</p>
Stockløsning zosuquidar 1 mg/ml	5 mg pulver løses i 500 $\mu\text{L}$ + 500 $\mu\text{L}$ MeOH og overfører til nytt rør hvor 4 mL MeOH tilsettes.
10 $\mu\text{M}$ zosuquidar	$M_w\ \text{zosuquidar} = 636.99\ \text{g/mol}$ $\frac{1\ \text{mg/mL}}{636.99\ \text{g/mol}} = 1,5698 \times 10^{-3}\ \text{M}$ $1569.8\ \mu\text{M} \times X\ \text{mL} = 10\ \mu\text{M} \times 10\ \text{mL}$ $X = 63.7\ \mu\text{L}$ <p>63.7 <math>\mu\text{L}</math> av stockløsning dampes av med nitrogen og reløses i 10 mL MeOH.</p>
1 $\mu\text{M}$ zosuquidar	$10\ \mu\text{M} \times X\ \text{mL} = 1\ \mu\text{M} \times 2\ \text{mL}$ $X = 200\ \mu\text{L}$ <p>200 <math>\mu\text{L}</math> av 10 <math>\mu\text{M}</math> zosuquidar-løsning dampes av med nitrogen og reløses i 2 mL inkubasjonsmedium.</p>
0,1 $\mu\text{M}$ zosuquidar	$1\ \mu\text{M} \times X\ \text{mL} = 0.1\ \mu\text{M} \times 2\ \text{mL}$ $X = 200\ \mu\text{L}$ <p>200 <math>\mu\text{L}</math> av 1 <math>\mu\text{M}</math> zosuquidar-løsning dampes av med nitrogen og reløses i 2 mL inkubasjonsmedium.</p>
0,01 $\mu\text{M}$ zosuquidar	$1\ \mu\text{M} \times X\ \text{mL} = 0.01\ \mu\text{M} \times 2\ \text{mL}$ $X = 20\ \mu\text{L}$ <p>20 <math>\mu\text{L}</math> av 10 <math>\mu\text{M}</math> zosuquidar-løsning dampes av med nitrogen og reløses i 2 mL inkubasjonsmedium.</p>

### **3.4 Friske personer**

Det ble brukt blodprøver fra friske frivillige til utvikling og validering av metoden. Blant de frivillige var fem menn og fire kvinner i alderen 23-60 år. Ingen av disse brukte immundempende legemidler.

### **3.5 Pasientmateriale**

Pasientmateriale var en del av metodeutviklingsstudien “Tacrolimus concentrations and associated protein expression and function in kidney biopsies” som er godkjent av Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Et av målene for denne studien var å utvikle og optimalisere en metode for måling av P-gp aktivitet i lymfocytter, der takrolimus har sitt virkested.

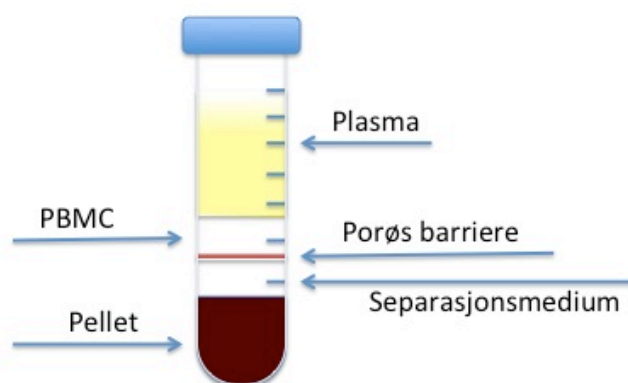
Inklusjonskriterier for denne delen av studien var nyretransplanterte pasienter over 18 år som hadde takrolimus som del av deres immunsuppressive terapi. Alle pasientene i studien gav skriftlig informert samtykke. Pasientene var under behandling ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet. Den immundempende behandlingen hos samtlige pasienter bestod av takrolimus, mykofenolat og prednisolon. Prøvene ble tatt ved en rutinekontroll 8 uker etter transplantasjon, og det ble da tatt 18 mL fullblod (EDTA) spesifikt til denne metodeutviklingen.

## 3.6 Opprinnelig metode

Metoden er basert på litteratur om rhodamin123-effluksmetoden og upublisert materiale fra forskningsgruppa (PK-gruppa) på avdeling for farmasøytisk biovitenskap ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo [64, 65].

### 3.6.1 Isolering av lymfocytter

For isolering av PBMC ble det tatt utgangspunkt i produktbeskrivelsen til Leucosep-rør. Fullblod ble tappet i EDTA-rør før 4 mL ble tilsatt 14 mL Falconrør og fortynnet forsiktig 1:1 med 4 mL kald PBS. Det fortynnede blodet ble forsiktig overført til et Leucosep-rør før sentrifugering ved 1000 g i 10 minutter. Sentrifugeringen foregikk ved romtemperatur, på sentrifuge med innsats som svinger ut (Multifuge). Under sentrifugeringen ble de ulike komponentene i blodet separert etter tetthet (figur 7). Det øverste sjiktet besto av plasma og blodplater, etterfulgt av et sjikt med PBMC. Erytrocytter og granulocytter gikk gjennom barrieren med polypropylen og la seg som en pellet i bunnen av røret.



**Figur 7. Tetthetssentrifugering med Leucosep-rør.** De ulike komponentene i blodet er separert etter tetthet. Det øverste sjiktet består av plasma og blodplater etterfulgt av sjikt med PBMC. Erytrocytter og granulocytter har lagt seg i bunnen av røret i form av en pellet.

Plasmalaget ble pipettert av og kastet til det gjensto omtrent 5 mm over PBMC-sjiktet, for å hindre kontaminering av PBMC med blodplater. Sjiktet med PBMC ble så pipettert over i et Falconrør. Cellene ble vasket ved forsiktig tilsetning av 10 mL PBS, og løsningen ble blandet ved å vende røret 6 ganger, før sentrifugering ved 300 g i 10 minutter ved romtemperatur. Etter sentrifugering ble supernatant helt av og kastet. Vask og sentrifugering ble så gjort på

tilsvarende måte enda en gang. Pelleten ble reløst i 0,5 mL PBS og blandet forsiktig før nye 1,5 mL PBS ble tilsatt og blandet.

### **3.6.2 Celletelling**

For å telle cellene ble en automatisert celleteller benyttet (Countess<sup>TM</sup> Automated cell counter). Cellesuspensjonen (10  $\mu$ L) ble blandet med 10  $\mu$ L tryptanblått, og 10  $\mu$ L av blandingen ble tilsatt cellekammeret.

### **3.6.3 Preparering av cellepellet**

Falconrøret ble fylt opp til 10 mL med PBS før sentrifugering ved 300 g i 10 min. Supernatanten ble forsiktig fjernet, og cellepelleten ble reløst i frysevæske (90% FCS + 10% DMSO). En mL av celsuspensjonen ble dråpevis tilsatt avkjølte cryorør, før cryorørene ble fryst ned 30 minutter i -20 °C. Cryorørene ble så overført til -70 °C i 24 timer før lagring i flytende nitrogen til senere bruk.

### **3.6.4 Tining av celler**

Cellene ble tatt opp fra lagring i flytende nitrogen til en fryser, som holdt -70 °C, i 30 minutter før de ble satt til tining i vannbad ved 37 °C. En mL RPMI og 2% FCS som holdt 37 °C ble tilsatt hvert cryorør over en periode på 30 sekunder. Innholdet i alle cryorørene ble så samlet i et rør som inneholdt oppvarmet 8 mL RPMI + 2% FCS per cryorør. Deretter fulgte sentrifugering ved 300 g i 10 minutter før supernatanten ble kastet og pellet ble reløst i 4 mL RPMI + 2% FCS. Cellene ble så satt til hvile på vannbad i en time ved 37 °C.

### **3.6.5 Celletelling og recovery**

Cellene ble talt ved automatisert celleteller (tre paralleller). Cellesuspensjonen (10  $\mu$ L) ble blandet med 10  $\mu$ L tryptanblått, og 10  $\mu$ L av denne blandingen ble tilsatt cellekammeret. Deretter ble recovery regnet ut på bakgrunn av tall fra celletelling ved isoleringen.

### 3.6.6 Aktivitet av P-gp – Rhodamin123-effluksmetoden

Røret med cellene ble sentrifugert ved 300 g i 10 minutter. Supernatanten ble kastet før cellepelleten ble reløst i 250  $\mu$ L + 2% FCS per antall prøver i forsøket. Cellesuspensjonen ble så fordelt på 8 eppendorfrør.

De 8 eppendorfrørene med 250  $\mu$ L cellesuspensjon i hvert rør ble fordelt slik:

- a. Med hemmer (tre paralleller)
- b. Uten hemmer (tre paralleller)
- c. Blank kontroll (to paralleller)

Rørene med og uten hemmer ble tilsatt 250  $\mu$ L RPMI + 2% FCS med 0,8  $\mu$ M rhodamin123. Den blanke kontrollen ble kun tilsatt 250  $\mu$ L RPMI + 2% FCS. Rørene ble så inkubert i 30 minutter ved 37 °C på ristebad før sentrifugering ved 300 g, 4 °C, i 10 minutter.

Etter sentrifugering ble cellene vasket en gang med iskaldt RPMI + 2% FCS for å stoppe aktiviteten av P-gp før ny sentrifugering ved 300 g i 10 minutter. Deretter ble supernatanten helt av og pelleten ble reløst. Tre av rørene ble tilsatt 500  $\mu$ L av en selektiv hemmer av P-gp, zosuquidar. De fem resterende rørene ble tilsatt 500  $\mu$ L RPMI + 2% FCS. Cellene ble så inkubert i 1 time ved 37 °C på ristebad før sentrifugering ved 300 g, 4 °C, i 10 minutter. Etter inkubering ble cellene vasket en gang med iskaldt PBS + 2% FCS før ny sentrifugering. Pelleten ble deretter resuspendert i 250  $\mu$ L PBS + 2% FCS før 200  $\mu$ L ble pipettert av til en sort brønn. Fluorescens av rhodamin123 ble avlest på en mikroplateleser (Victor<sup>TM</sup>).

## 3.7 Optimalisering av metoden

### 3.7.1 Isolering av lymfocytter

#### *Leucosep-rør vs. CPT-rør*

For optimalisering av metoden ble ulike typer rør benyttet ved blodprøvetapping og i isoleringsprosessen. Det ble tappet blod i 5 EDTA-rør og 4 CPT-rør. Begge rørtypene ble vendt 8-10 ganger etter tappingen. Blodet i EDTA-rørene ble så fortynnet 1:1 med PBS i Falconrør før overføring til Leucosep-rør. Leucosep-rørene ble deretter sentrifugert ved 1000 g i 10 minutter med retardasjonsgrad 4. Etter sentrifugering ble PBMC-laget fra to og to Leucosep-rør overført til et Falconrør. CPT-rørene ble uten annen forbehandling sentrifugert ved 1720 g i 30 minutter. Etter sentrifugering ble PBMC-laget sugd av med plaspipette til Falconrør før vask med PBS. Vaskeprosedyren var den samme for EDTA- og CPT-blod. To og to cellepelletter fra CPT-blod ble slått sammen etter vask. Celletellingen og resten av prosedyren videre var lik for de to isoleringsmetodene.

#### *Retardasjonsgrad*

I to uavhengige forsøk ble det undersøkt om hard (retardasjonsgrad 9) versus myk (retardasjonsgrad 4) retardasjon under gradientsentrifugeringen var av betydning for isoleringen.

#### *Antall vasketrinn*

Etter at laget med PBMC ble isolert fra fullblod ble det vasket med PBS for minst mulig kontaminering med blodplater. I optimaliseringsprosessen ble 10 mL PBS tilsatt til hvert rør, sentrifugert og reløst i ny PBS to eller tre ganger. Det ble sett på antall lymfocytter isolert og viabilitet.

### 3.7.2 Celletelling

Innledningsvis ble antall lymfocytter talt med automatisk celleteller. På grunn av mistanke om for høyt celletall ble det også benyttet manuell telling med Bürker-kammer. Disse ble sammenlignet for å få kontroll på fordelingen av likt antall lymfocytter per eppendorfrør til videre forsøk.

### **3.7.3 Preparering av cellepellet/Tining av celler/Celletelling og recovery**

Disse trinnene i den opprinnelige metoden ble utelatt da det ble antatt å være en fordel for viabiliteten av lymfocytene på bakgrunn av innledende forsøk.

### **3.7.4 Aktivitet av P-gp – Rhodamin123-effluksmetoden**

#### *RPMI 1640 med eller uten fenolrødt*

For å ha best mulig visuell kontroll over pellet og likt antall celler i hvert eppendorfrør ble RPMI 1640 både med og uten fenolrødt brukt i flere forsøk.

#### *Sentrifugeringshastighet og tid*

Ulike hastigheter og tider på sentrifugering ble undersøkt underveis i optimaliseringsprosessen. Følgende ble testet: 300 g i 10 minutter, 500 g i 10 minutter, 700 g i 6 minutter og 1000 g i 5 minutter, alle ved 4 °C. Disse ble sammenlignet med hensyn på antall lymfocytter isolert og viabilitet ved mikroskopering.

#### *Konsentrasjon av zosuquidar*

Ulik konsentrasjon av P-gp hemmeren zosuquidar under inkubering ble undersøkt (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM) og sammenlignet med hensyn på fluorescens og ratio for P-gp aktivitet. Det ble benyttet tre paralleller for hver konsentrasjon.

#### *Ny zosuquidar- og rhodamin123-løsninger til hvert forsøk*

Samme løsninger ble brukt i flere forsøk med et par dagers mellomrom i innledende forsøk. Med en teori om at virkningen til rhodamin123 og zosuquidar ble dårligere jo lenger løsningene sto, ble det etterhvert laget nye løsninger til hvert forsøk. Det ble testet for forskjell i ratio med ferske og gamle løsninger mens de resterende betingelsene var identiske.

## 3.8 Endelig metode

### 3.8.1 Isolering av lymfocytter

For isolering av PBMC ble det tatt utgangspunkt i produktbeskrivelsen til Leucoseprør. Fullblod ble tappet i EDTA-rør før 4 mL ble tilsatt 14 mL Falconrør og fortynnet forsiktig 1:1 med 4 mL kaldt fosfatbufret saltvann (PBS). Det fortynnede blodet ble forsiktig overført til et Leucoseprør før sentrifugering ved 1000 g i 10 minutter med retardasjonsgrad 4. Sentrifugeringen foregikk ved romtemperatur, på sentrifuge med innsats som svinger ut (Multifuge). Sjøkket med PBMC ble så pipettert over i et Falconrør. Cellene ble vasket ved forsiktig tilsetning av 10 mL PBS, og løsningen ble blandet ved å vende røret 6 ganger, før sentrifugering ved 300 g i 10 min ved romtemperatur. Etter sentrifugering ble supernatant helt av og kastet. Vask og sentrifugering ble så gjort på tilsvarende måte enda en gang. Pelleten ble reløst i 0,5 mL PBS og blandet forsiktig før alle rørene ble slått sammen.

### 3.8.2 Celletelling

For å telle cellene ble en automatisert celleteller benyttet (Countess<sup>TM</sup> Automated cell counter). Cellesuspensjonen (10 µL) ble blandet med 10 µL tryptanblått, og 10 µL av blandingen ble tilsatt cellekammeret. I tillegg ble manuell telling foretatt ved bruk av Bürker-kammer. Da ble 20 µL cellesuspensjon blandet med 20 µL tryptanblått, før 20 µL av blandingen ble tilsatt cellekammeret.

### 3.8.3 Aktivitet av P-gp – Rhodamin123-effluksmetoden

Røret med cellene ble sentrifugert ved 500 g i 10 minutter. Supernatanten ble kastet før cellepelleten ble reløst i 250 µL + 2% FCS per antall prøver i forsøket. Det ble tatt høyde for at hvert eppendorfrør inneholdt minimum  $2 \times 10^6$  celler. Cellesuspensjonen ble så fordelt på 8 eppendorfrør.

De 8 eppendorfrørene med 250 µL cellesuspensjon i hvert rør ble fordelt slik:

- a. Med hemmer (tre paralleller)
- b. Uten hemmer (tre paralleller)
- c. Blank kontroll (to paralleller)



Rørene med og uten hemmer ble så tilsatt 250  $\mu$ L RPMI + 2% FCS med 0,8  $\mu$ M rhodamin123. Ny løsning ble laget til hvert forsøk. Den blanke kontrollen ble kun tilsatt 250  $\mu$ L RPMI + 2% FCS. Rørene ble så inkubert i 30 minutter ved 37 °C på ristebad før sentrifugering ved 500 g, 4 °C, i 10 minutter. Deretter ble cellene vasket en gang med iskaldt RPMI + 2% FCS før ny sentrifugering ved 500 g i 10 minutter. Etter sentrifugering ble supernatanten helt av og pelleten ble reløst.

Tre av rørene ble tilsatt 500  $\mu$ L av en 1  $\mu$ M-løsning med P-gp hemmeren zosuquidar. De fem resterende rørene ble tilsatt 500  $\mu$ L RPMI + 2% FCS. Ny løsning ble laget til hvert forsøk. Cellene ble så inkubert i 1 time ved 37 °C på ristebad før sentrifugering ved 500 g, 4 °C, i 10 minutter. Etter inkubering ble cellene vasket en gang med iskaldt PBS + 2% FCS før ny sentrifugering. Pelleten ble så resuspendert i 250  $\mu$ L PBS + 2% FCS før 200  $\mu$ L ble pipettert av til en sort brønn. Fluorescens av rhodamin123 ble avlest på en mikroplateleser (Victor<sup>TM</sup>).

For mer detaljert beskrivelse av endelig metode, se laboratorie-protokollen i appendiks A.

### **3.9 Databearbeidelse**

Etter at fluorescens ble avlest på en mikropplateleser (Victor™) ble P-gp aktivitet bestemt ved å beregne ratio av rhodamin123 fluorescens med og uten den selektive P-gp hemmeren zosuquidar. Alle forsøkene ble utført med tre paralleller, og det ble beregnet gjennomsnittsfluorescens av de tre parallellene for både med og uten hemmer, før blank kontroll ble trukket fra. Gjennomsnittstallet med hemmer ble så delt på gjennomsnittstallet uten hemmer for å finne ratioen for P-gp aktivitet (ligning 1). En ratio over 1,0 indikerer aktivitet av P-gp.

### **3.10 Validering**

I tråd med god laboratoriepraksis (GLP) ble det utført validering av intradag- og interdagpresisjon. Til intradagpresisjonen ble det brukt fem til syv paralleller for med og uten hemmer hos totalt fire forsøkspersoner. Gjennomsnitt, relativt standardavvik (SD) og prosentvis avvik (variasjonskoeffisient (CV)) ble beregnet. Samtlige prøver ble preparert og behandlet på samme måte. For interdagpresisjon ble det brukt ratio for P-gp aktivitet fra tre ulike dager. Gjennomsnitt, SD og CV ble beregnet.

### **3.11 Statistikk**

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av statistikkprogrammet Statistical Package for the Sosial Sciences (SPSS®) (versjon 22 for Mac, IBM Corporation, Armonk, NY). Fordi utvalget var lite, og ikke normalfordelt, ble det brukt ikke-parametriske tester. Data fra avhengige grupper ble testet ved paret Wilcoxon-test. Grensen for statistisk signifikans ble satt til  $P < 0,05$  (tosidig test).

# 4 Resultater

## 4.1 Metodeoptimaliseringen

### 4.1.1 Isolering av lymfocytter

#### *Leucosep-rør vs. CPT-rør*

Bruk av ulike rør til blodprøvetapping og sentrifugering viste at Leucosep-rørene ga 34 % flere isolerte lymfocytter per mL enn CPT-rørene. Viabiliteten var imidlertid den samme for begge rørtypene. For videre forsøk ble Leucosep-rør benyttet.

#### *Retardasjonsgrad*

Utbyttet av lymfocyttiliseringen økte ved bruk av myk retardasjon etter sentrifugeringen. De to uavhengige forsøkene viste en dobling i antall lymfocytter isolert med myk retardasjon (retardasjonsgrad 4) i forhold til hard retardasjon (retardasjonsgrad 9). Myk retardasjon etter sentrifugering ble derfor benyttet i videre forsøk.

#### *Antall vasketrinn*

Testing av antall vaskerunder under isoleringsprosessen viste at to vasketrinn med PBS var best egnet, med hensyn til antall lymfocytter isolert og lymfocyttenes viabilitet. I to uavhengige forsøk ga to omganger med vasking henholdsvis 50% og 113% økt antall lymfocytter isolert sammenlignet med tre omganger vasking. Viabiliteten av lymfocytterne var også noe høyere ved to vasketrinn enn ved tre vaskinger. På bakgrunn av dette ble to vaskerunder benyttet i videre forsøk.

### 4.1.2 Celletelling

Forskjell i celleantall ved automatisk og manuell telling viste seg å være betydelig. I et forsøk oppgav den automatiske celletelleren antall lymfocytter til å være  $9,7 \times 10^6$  per mL, som totalt i 4 mL tilsvarer  $38,8 \times 10^6$  lymfocytter. Ved manuell telling av samme cellesuspensjon ble totalt antall lymfocytter anslått å være  $24,0 \times 10^6$ . Den automatiske celletelleren oppgav et 60% høyere celletall enn manuell celletelling. Et annet forsøk gav 105% høyere antall lymfocytter ved automatisk i forhold til manuell telling. Da celletelleren var ny og kalibrert ble det mistenkt at det kunne være vekst i løsningen med tryptanblå. Dette viste seg å stemme da tryptanblå ble kontrollert for vekst ved både celletelling og mikroskopering. Etter dette ble

løsningen med tryptanblå byttet ut, og det har vært minimal forskjell på antall lymfocytter ved automatisk og manuell telling etter dette. Celletelling i videre forsøk har imidlertid likevel blitt utført med både automatisk og manuell telling for å ha god kontroll på celleantallet.

#### 4.1.3 Aktivitet av P-gp – Rhodamin123-effluksmetoden

##### *RPMI 1640 med eller uten fenolrødt*

Visuell kontroll av pelleten underveis i forsøket viste seg å være enklere ved bruk av RPMI uten fenolrødt i forhold til med fenolrødt (figur 8). Da dette ble ansett som et viktig kontrollpunkt i forsøket ble RPMI uten fenolrødt benyttet i videre forsøk.



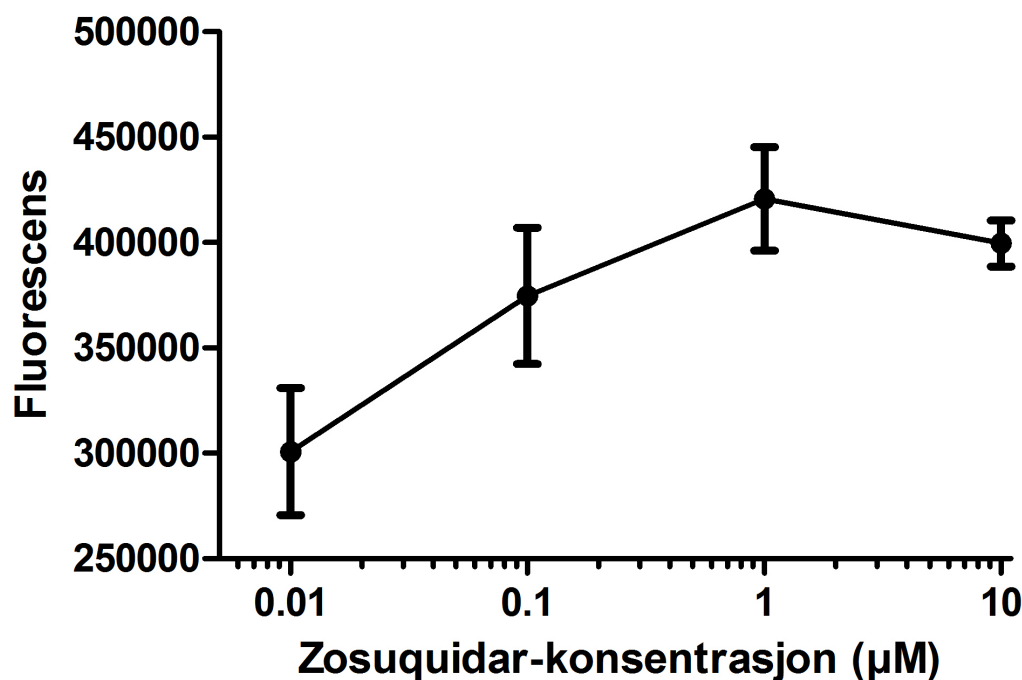
**Figur 8. Pellet i RPMI uten og med fenolrødt.** Pellet i RPMI uten (til venstre) og med (til høyre) fenolrødt.

##### *Sentrifugeringshastighet og tid*

Undersøkelse av ulike sentrifugeringshastigheter og tider før og etter inkubasjonen viste at viabiliteten var omtrent lik for de ulike hastighetene. Mikroskopering viste imidlertid at det var flere døde celler jo høyere sentrifugeringshastighet som ble benyttet. Det var liten forskjell mellom 300 g og 500 g. På bakgrunn av dette ble det bestemt å benytte 500 g i 10 minutter i videre forsøk.

##### *Konsentrasjon av zosuquidar*

Ulike konsentrasjoner av P-gp hemmeren zosuquidar viste at 1  $\mu\text{M}$  var optimalt i forhold til fluorescens (figur 9). Ved lavere konsentrasjoner av zosuquidar var variasjonen i fluorescens mellom parallellene noe høyere. Ved den høyeste konsentrasjonen (10  $\mu\text{M}$ ) viste fluorescensen en svak nedgang.



**Figur 9.** Effekt av zosuquidarkonsentrasjon på fluorescens av rhodamin123 i PBMC. Resultater er presentert som gjennomsnitt +/- SD for tre paralleller (n=1).

#### *Nye zosuquidar- og rhodamin123-løsninger til hvert forsøk*

Ved bruk av rhodamin123- og zosuquidar-løsninger laget to eller flere dager i forveien ble det sett lavere P-gp aktivitet enn i forsøk der løsningene var nylaget. Hos en person ble det målt en P-gp aktivitet på 1,6 ved tillaging av nye løsninger mot 1,5 ved bruk av to dager gamle løsninger. Hos en annen person ble det målt en ratio på 1,0 ved fire dager gammel løsning og 1,1 ved to dager gammel løsning mot 1,5 ved nylaget løsning. På bakgrunn av dette ble det laget nye løsninger til hvert enkelt forsøk for mer standardiserte betingelser.

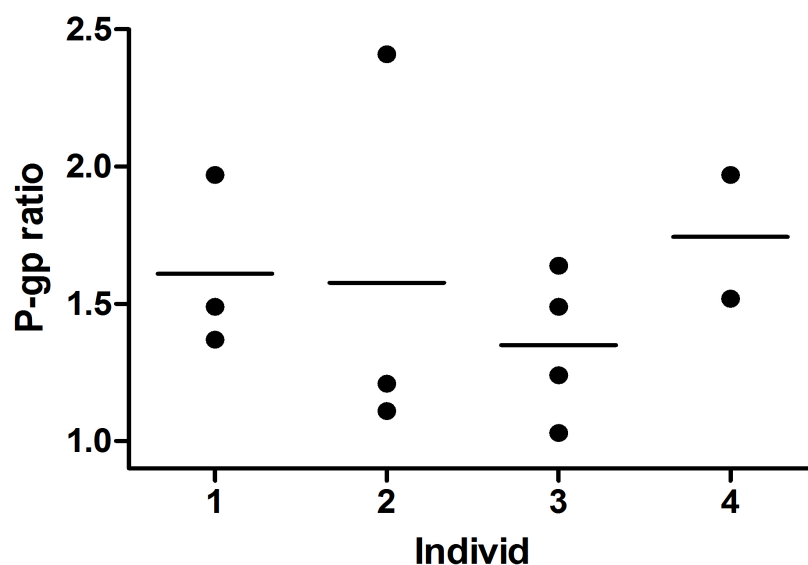
#### *P-gp aktivitet*

Det ble i alle forsøkene benyttet tre paralleller for måling av fluorescens med og uten hemmer. Variasjonen mellom parallellene var stor i de fleste forsøkene. Halvparten av variasjonskoeffisientene viste seg å relativt høye (tabell 5). Variasjonskoeffisientene for P-gp aktivitet mellom dager var på 20%, 46%, 20% og 18% for henholdsvis individ 1, 2, 3 og 4.

**Tabell 5. P-gp aktivitet illustrert ved fluorescens med og uten hemmer, og ratio for 4 forsøkspersoner.** Viser gjennomsnitt, SD og CV av fluorescens med og uten hemmer i tre paralleller. Hver linje indikerer variasjon innad en dag. Romertall viser forsøk på ulike dager. Gjennomsnitt er oppgitt som absolutte fluorescenstall.

Individ	Forsøk	Med hemmer			Uten hemmer			P-gp Ratio
		Snitt 10 <sup>5</sup>	SD 10 <sup>5</sup>	CV %	Snitt 10 <sup>5</sup>	SD 10 <sup>5</sup>	CV %	
1	I	0,76	0,17	22	0,51	0,05	10	1,5
	II	1,3	0,4	28	0,972	0,002	1	1,4
	III	4,4	0,7	15	2,2	0,2	7	2,0
2	I	0,15	0,02	16	0,14	0,05	34	1,1
	II	2,7	0,4	16	1,1	0,5	49	2,4
	III	1,5	0,5	33	1,3	0,5	42	1,2
3	I	1,4	0,1	6	0,84	0,18	22	1,6
	II	0,36	0,25	70	0,24	0,01	4	1,5
	III	0,29	0,09	30	0,24	0,25	104	1,2
	IV	3,9	0,6	14	3,8	0,4	10	1,0
4	I	1,3	0,2	9	0,85	0,38	45	1,5
	II	0,54	0,01	2	0,27	0,06	23	2,0

Totalt var 4 individer involvert i optimaliseringsprosessen, og aktiviteten av P-gp varierte relativt mye mellom dager hos samme person. P-gp ratioene som ble målt varierte fra 1,0 til 2,4 (tabell 5 og figur 10).



**Figur 10. Oversikt over P-gp aktivitet underveis i optimaliseringen for de ulike individene.** P-gp aktivitet er angitt som ratio og linjen viser gjennomsnitt. n=3 for individ 1 og 2, n=4 for individ 3 og n=2 for individ 4.

## 4.2 Validering av metoden

Hensikten med valideringen var å se på metodens presisjon innad en dag og mellom dager. Av den grunn ble det gjennomført ett forsøk per forsøksperson med hensyn på intradag-variasjon (forsøk III) og to forsøk per forsøksperson med hensyn på interdag-variasjon (forsøk I og II) (tabell 6). Resultatene fra forsøkene viser variasjon i fluorescens mellom de ulike parallellene med og uten hemmer, som danner grunnlaget for både intradag-variasjon og interdag-variasjon.

**Tabell 6. Oversikt over variasjon i fluorescens mellom parallellene og mellom forsøk.** Det ble anvendt tre paralleller for med og uten hemmer i forsøk I-II for å studere interdag-variasjon, og fem til syv paralleller i forsøk III for å studere intradag-variasjon. Gjennomsnittstall er oppgitt som absolutte fluorescenstall.

Forsøks- person	Forsøk	Med hemmer			Uten hemmer		
		Snitt 10 <sup>5</sup>	SD 10 <sup>5</sup>	CV %	Snitt 10 <sup>5</sup>	SD 10 <sup>5</sup>	CV %
1	I	3,1	0,2	6	2,1	0,2	8
	II	3,7	0,7	19	2,5	0,3	13
	III*	3,4	0,2	6	2,1	0,4	16
2	I	2,6	<0,1	1	1,8	0,6	33
	II	5,2	0,7	14	3,4	0,3	10
	III*	5,2	0,5	9	3,3	0,3	8
3	I	4,8	0,1	2	3,3	0,3	8
	II	8,0	0,2	3	5,4	0,3	5
	III**	6,3	1,1	17	4,1	0,8	19
4	I	1,2	0,1	12	1,1	0,3	25
	II	4,1	0,8	20	3,2	0,4	11
	III**	3,1	0,5	17	2,1	0,3	16

\*Anvendt syv paralleller \*\*Anvendt fem paralleller

### 4.2.1 Intradag-variasjon

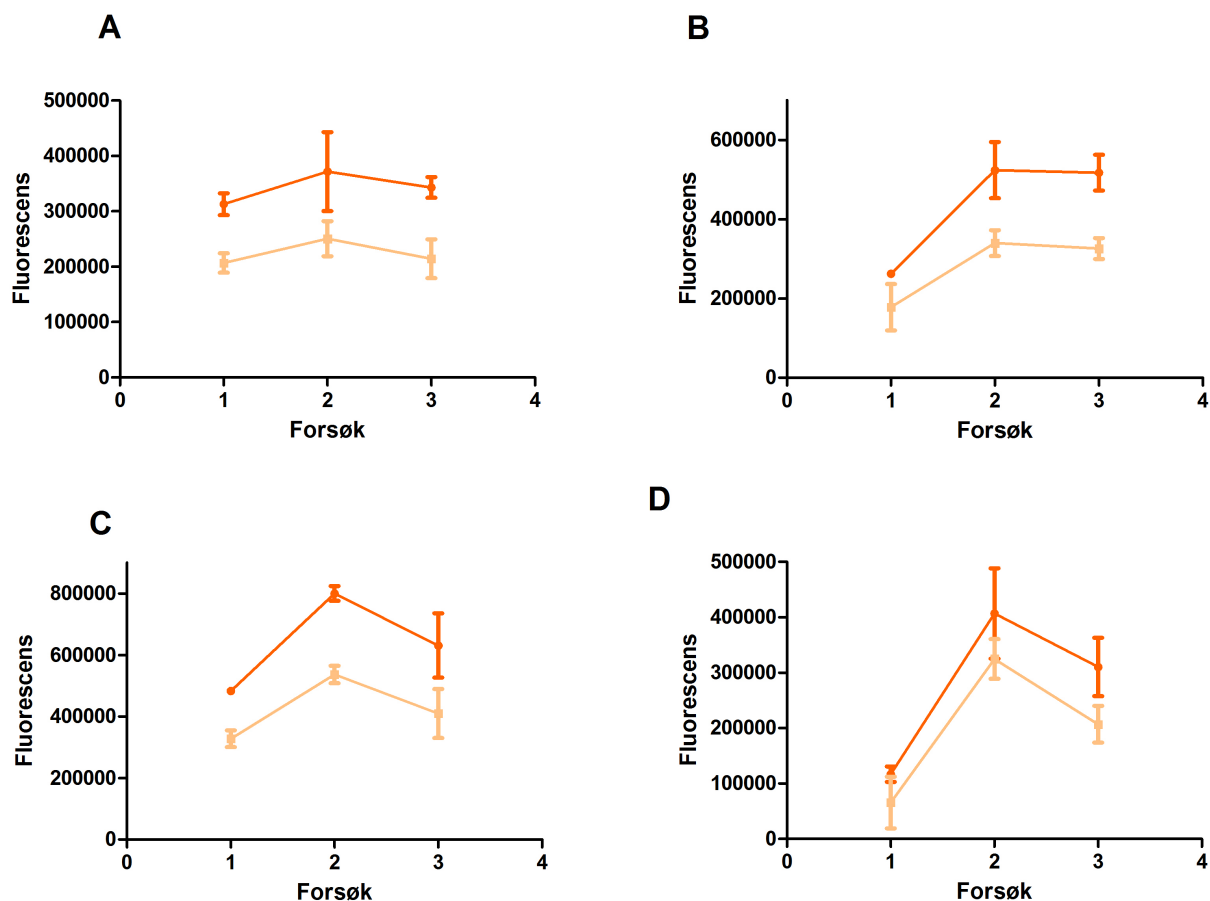
Forsøk III (tabell 6) ble utført for å studere intradag-variasjonen mellom de ulike parallellene for både med og uten hemmer, da disse forsøkene ble utført med et større antall paralleller. Forsøkene ga et tilfredsstillende resultat i forhold til analysemetodens presisjon. Variasjonskoeffisienten var under 20% i alle forsøkene (tabell 7). Det ble også vist en signifikant forskjell i fluorescens med og uten hemmer for forsøksperson 1, 2 og 4.

**Tabell 7. Intradag-variasjon.** (forsøk III for samtlige forsøkspersoner). Oversikt over variasjon i fluorescens mellom de ulike parallellene. Det ble anvendt fem eller syv paralleller med og uten hemmer. Gjennomsnittstall er oppgitt som absolutte fluorescenstall. P-verdien er beregnet for forskjell i fluorescens med og uten hemmer for 95% konfidensintervall.

Forsøks- person	Med hemmer			Uten hemmer			P-verdi
	Snitt $10^5$	SD $10^5$	CV %	Snitt $10^5$	SD $10^5$	CV %	
1*	3,4	0,2	6	2,1	0,4	16	0,018
2*	5,2	0,5	9	3,3	0,3	8	0,018
3**	6,3	1,1	17	4,1	0,8	19	0,080
4**	3,1	0,5	17	2,1	0,3	16	0,043

\*Anvendt syv paralleller \*\*Anvendt fem paralleller

Fluorescensintensiteten varierte fra forsøk til forsøk for hver forsøksperson (figur 11 A-D). Den viste ingen sammenheng mellom variasjonen i parallellene. Høyest fluorescens gir ikke nødvendigvis høyest parallellvariasjon. Forholdet mellom med og uten hemmer er et mål på P-gp aktivitet, og dette varierte lite.



**Figur 11. Variasjon i fluorescens mellom parallellene.** Variasjonen innad en dag er vist som gjennomsnitt +/- SD. SD angir variasjonen i fluorescens mellom tre paralleller for med (oransje) og uten (gul) hemmer. A: Fluorescens variasjon hos forsøksperson 1 (n=3). B: Fluorescens variasjon hos forsøksperson 2 (n=3). C: Fluorescens variasjon hos forsøksperson 3 (n=3). D: Fluorescens variasjon hos forsøksperson 4 (n=3).



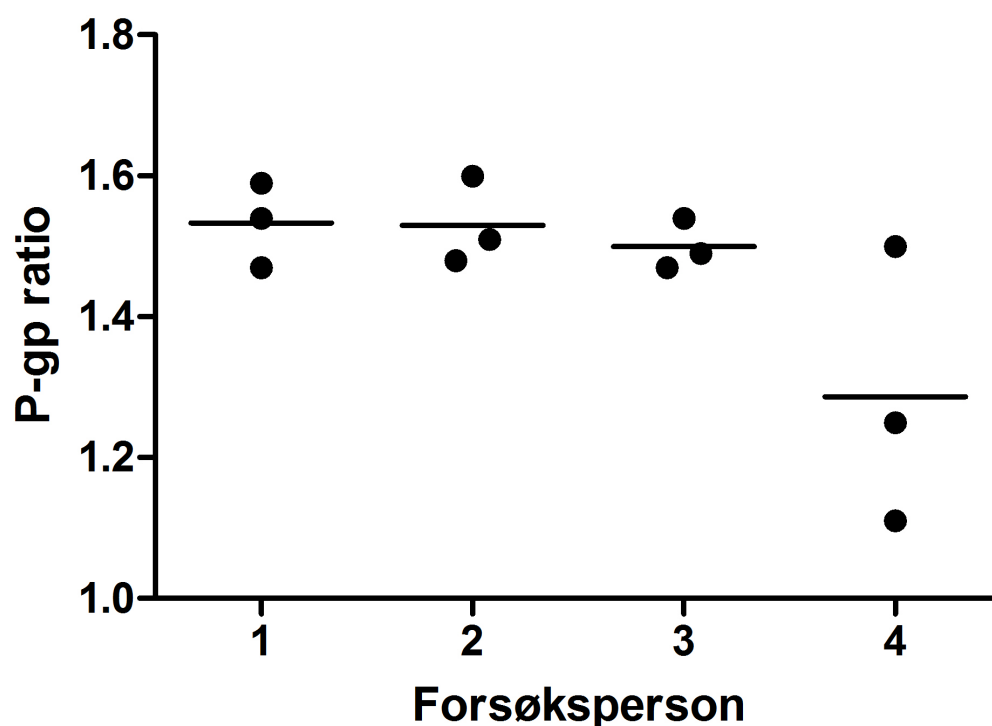
### 4.2.2 Interdag-variasjon

P-gp aktivitet fra alle de tre forsøksdagene ble sammenlignet for hver enkelt forsøksperson. P-gp aktiviteten varierte fra 1,1 til 1,6 (tabell 8). Metodens interdagpresisjon var tilfredsstillende med variasjonskoeffisienter på 3%, 4%, 2% og 15% for henholdsvis forsøksperson 1, 2, 3 og 4.

**Tabell 8. Oversikt over variasjon i P-gp aktivitet mellom dager i valideringen.** P-gp aktivitet er oppgitt som ratio .

Forsøksperson	P-gp ratio					
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Snitt	SD	CV (%)
1	1,5	1,5	1,6	1,5	0,1	4
2	1,5	1,5	1,6	1,5	0,1	4
3	1,5	1,5	1,5	1,5	<0,1	2
4	1,3	1,1	1,5	1,3	0,2	15

P-gp aktiviteten varierte relativt lite mellom de friske forsøkspersonene, fra 1,1 til 1,6 (figur 12). Variasjonskoeffisienten mellom forsøkspersonene var 9,7%.



**Figur 12. Oversikt over P-gp aktivitet hos de ulike forsøkspersonene i valideringen.** Aktiviteten er målt på tre forskjellige dager. P-gp aktivitet er angitt som ratio og linjen viser gjennomsnitt.

## 4.3 Resultater pasienter

I løpet av våren 2014 ble det inkludert tre transplanterte pasienter. Det var en kvinne og to menn i alderen 31-67 år (tabell 9).

**Tabell 9. Demografiske data for pasientene.**

	Pasient 1	Pasient 2	Pasient 3
<b>Kjønn</b>	M	M	K
<b>Alder</b>	67	31	31
<b>Transplantert vev</b>	Nyre	Pankreas	Nyre
<b>Kontroll</b>	8 uker	8 uker	8 uker
<b>Vekt</b>	71.8 kg	81 kg	75.5 kg
<b>Immunosuppressiv behandling</b>	Takrolimus 4 mg	Takrolimus 9 mg	Takrolimus 6.5 mg
	Mykofenolat 1.5 g	Mykofenolat 2 g	Mykofenolat 1.5 g
	Prednisolon 10 mg	Prednisolon 10 mg	Prednisolon 10 mg
<b>Andre legemidler</b>	Bactrim	Valcyte	Bactrim
	Somac	Somac	Somac
	Albyl-E	Albyl-E	Karvedilol
	Metoprolol		Sarotex
	Spiriva		Imovane
	Seretide		Estradepot plaster
	Humalog		

K=kvinne, M=mann

### 4.3.1 Intradag-variasjon

Variasjonen innenfor de ulike parallellene for med hemmer var 12%, 20% og 7% for henholdsvis pasient 1, 2 og 3. Parallellvariasjonen uten hemmer var 11%, 26% og 5% for henholdsvis pasient 1, 2 og 3 (tabell 10).

**Tabell 10. Variasjon i fluorescens mellom parallellene hos pasientene.** Det ble anvendt tre paralleller for med og uten hemmer.

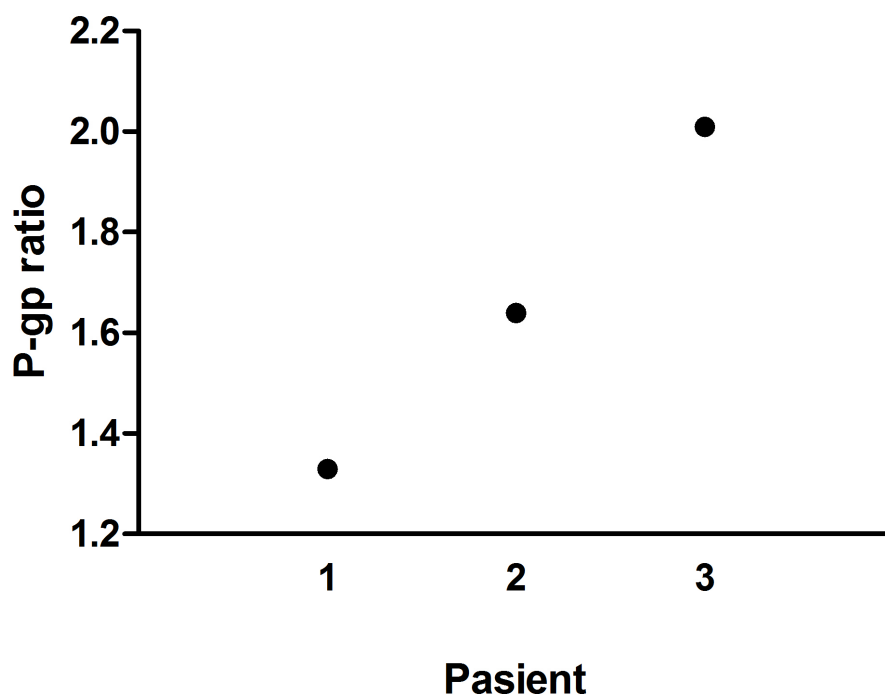
Pasient	Med hemmer			Uten hemmer		
	Snitt 10 <sup>5</sup>	SD 10 <sup>5</sup>	CV %	Snitt 10 <sup>5</sup>	SD 10 <sup>5</sup>	CV %
1	7,0	0,9	12	5,2	0,6	11
2	2,4	0,5	20	1,5	0,4	26
3	4,5	0,3	7	2,2	0,1	5

### 4.3.2 Aktivitet av P-gp

P-gp aktivitet ble målt til 1,3 for pasient 1, 1,6 for pasient 2 og 2,0 for pasient 3 (figur 13).

P-gp aktiviteten varierte mer mellom pasientene enn mellom de friske forsøkspersonene.

Variasjonskoeffisienten mellom pasientene var 21%.



Figur 13. P-gp aktivitet hos de tre pasientene. P-gp aktivitet er oppgitt som ratio.

## 5 Diskusjon

Det er i denne oppgaven utviklet og optimalisert en metode til måling av P-gp aktivitet i PBMC ved rhodamin123-effluksmetoden. Type rør benyttet i isoleringen av PBMC, grad av retardasjon, antall vaskerunder med PBS, sentrifugeringshastighet og konsentrasjon av hemmer er trinn i metoden som har blitt optimalisert. Det er sett på intra- og interdag-variabilitet ved henholdsvis fluorescens og P-gp ratio. Metoden har blitt optimalisert i friske, frivillige personer, og den har videre blitt anvendt til bestemmelse av P-gp aktivitet i PBMC isolert fra transplanterte pasienter.

### 5.1 Metodeoptimaliseringen

Ved optimalisering av utviklet metode ble det benyttet Leucosep-rør for isolering av PBMC fremfor CPT-rør, da Leucosep-rørene ga høyere PBMC utbytte. Andre studier benytter Ficoll gradientsentrifugering [39, 62] eller CPT-rør [64, 65] for isolering av PBMC. Bruken av Leucosep-rør fremfor CPT-rør samsvarer med resultater fra Nilsson et al., som utførte en studie der CPT-rør og Leucosep-rør ble sammenlignet med Ficoll-Paque gradient celleseparasjon [66]. Der ble det vist at CPT rør ga lavere utbytte og viabilitet av PBMC sammenlignet med Ficoll-Paque. I samme studie ble det også undersøkt om det var forskjell mellom isolering med Ficoll-Paque og Leucosep-rør. Isolering av PBMC med Leucosep-rør ga signifikant høyere utbytte og høyere viabilitet enn med Ficoll-Paque [66]. Separasjon med Ficoll-Paque er høyst operatørvhengig for å få maksimalt utbytte og er vanskelig å standardisere. Leucosep-rør og CPT-rør er designet for å minske interpersonell variabilitet ved at de er ferdigfylte med separasjonsmedium. Leucosep-rørene har i tillegg en fysisk barriere mellom separasjonsmediumet og fortynnet blod som hindrer blanding av disse før sentrifugering. Barrieren hindrer også kontaminering av PBMC-laget med røde blodceller etter sentrifugering [66, 67]. Bruken av CPT-rør gir to arbeidstrinn mindre enn bruken av Leucosep-rør da blod kan bli tappet og separert i samme rør uten fortynning. Dette veier imidlertid ikke opp for 34% færre isolerte PBMC sammenlignet med Leucosep-rør, da de to arbeidstrinnene som unngås ikke er spesielt tidkrevende. Følgelig ble isolering av PBMC med Leucoseprør ansett som best egnet i denne metoden.

Parametere som viste seg å være av betydning i isoleringsprosedyren var grad av retardasjon under sentrifugeringen, antall vaskerunder med PBS og sentrifugeringshastighet. Fordi lymfocytter er skjøre ble det sett på om det var noen forskjell på myk og hard retardasjon i forhold til antall isolerte lymfocytter. Det er ikke funnet noen andre studier på dette, men da det ble sett en dobling i antall isolerte lymfocytter med myk retardasjon sammenlignet med hard retardasjon for to forsøk, ble myk retardasjon benyttet i videre forsøk. To vaskerunder med PBS viste seg å være fordelaktig fremfor tre vaskerunder da flere lymfocytter ble isolert per mL celsuspensjon. Viabiliteten var også høyere ved bruk av to fremfor tre vaskerunder. Andre studier gjort med rhodamin123-effluksmetoden har også benyttet to vaskerunder med PBS [64, 65]. Når det gjelder sentrifugeringshastighet er det i litteraturen benyttet flere ulike hastigheter fra 400-700 g [33, 39, 68]. I den endelige metoden har 500 g blitt benyttet da det ikke var noen nevneverdig forskjell mellom 300 og 500 g. Ved sentrifugeringshastigheter over 500 g (700 og 1000 g) var det imidlertid flere døde celler jo høyere hastighet. På bakgrunn av dette ble 500 g benyttet i videre forsøk.

Rhodamin123-effluksmetoden er en mye brukt for måling av P-gp aktivitet i PBMC [23, 63, 69]. Andre prober som avgir fluorescens er beskrevet i litteraturen som mål på P-gp funksjon, deriblant Calcein-AM [70]. Calcein-AM i seg selv avgir ikke fluorescens, men blir spaltet til fluorescerende calcein av esteraser i cellemembranen. Calcein-AM blir transportert av P-gp direkte fra cellemembranen uten å entre cytoplasma. Calcein er derimot ikke substrat for P-gp. Dette gjør calcein til en mindre egnet probe for P-gp aktivitet [71]. En studie av Feller et al. fant rhodamin123 som den mest sensitive metoden for måling av P-gp aktivitet sammenlignet med calcein-AM og daunorubicin (DNR) [69]. Studien viste videre at rhodamin123 er lite egnet for måling av ("multidrug resistance-related protein") MRP-funksjon, men calcein-AM og DNR kan brukes [69]. Selv om rhodamin123 er en egnet probe for måling av P-gp aktivitet blir den også transportert av MRP, men med signifikant lavere transporteffektivitet [69]. På bakgrunn av dette ble rhodamin123 vurdert som en godt egnet probe for bestemmelse av P-gp aktivitet i denne metoden.

Zosuquidar ble benyttet som hemmer av P-gp. Det ble valgt en hemmerkonsentrasjon av zosuquidar på 1  $\mu$ M da denne viste seg å ha god hemming ut fra sentrifugeringsforsøket (figur 9). Dette ble kun vist i et forsøk, men sammenfaller med andre studier, der 1  $\mu$ M zosuquidar er benyttet [64, 72, 73]. Zosuquidar ble anvendt på bakgrunn av at den er en selektiv modulator av P-gp, og binder seg til P-gp med høy affinitet [74]. Studier har vist at

zosuquidar ikke er et substrat for P-gp-mediert effluks, og er heller ikke forventet å endre den katalytiske aktiviteten til CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 og CYP1A2 eller modulere aktiviteten til transportørene MRP1 og MRP2 [73]. Zosuquidar er en godt egnet P-gp hemmer *in vitro*, med da det ikke vil være forventet spesielle farmakokinetiske legemiddelinteraksjoner er den også godt egnet som P-gp hemmer *in vivo*, i konsentrasjoner under 1  $\mu\text{M}$  [73]. Verapamil og ciklosporin er også mye brukte hemmere i rhodamin123-effluksmetoden [75, 76]. Disse hemmer imidlertid også MRP1, og en annen ulempe er at de også benyttes i terapeutisk sammenheng [73]. Zosuquidar er rapportert å være en 500 og 1500 ganger mer potent hemmer av P-gp enn henholdsvis ciklosporin og verapamil i en human MDR-resistent cellelinje [68]. Den er også vist å beholde sin gode hemmeraktivitet i humant fullblod [68]. Da zosuquidar er farmakologisk inert og en selektiv og potent hemmer av P-gp, ble den benyttet i denne metoden.

## 5.2 Resultatevaluering

Valideringen av metoden viste god presisjon med hensyn til intradag-variabilitet. Størsteparten av variasjonskoeffisientene var under 20%, og noen var helt nede i 6-9% (tabell 7). Det er under grensen for variasjon ved bioanalytiske metoder fra Food and Drug Administration (FDA) [77]. I tillegg støtter forsøkene med tre paralleller den lave variasjonen i intradag-valideringen, med kun tre variasjonskoeffisienter over 20% (tabell 6). Da dette er en biologisk metode må dette anses å være tilfredsstillende presisjon. Innledningsvis i metodeutviklingen var det stor variabilitet mellom parallellene ved måling av fluorescens (tabell 5). En grunn til det kan være at det i optimaliseringsprosessen ble foretatt endringer i ulike trinn i metoden. Dermed ble ikke forsøkene utført med samme betingelser, og trinn i metoden som senere viste seg å være sensitive var ikke optimalisert.

Måling av P-gp aktivitet hos friske frivillige med den endelige metoden gav ratioer fra 1,1 til 1,6 (tabell 8). Cortada et al. har studert fordelingen av P-gp aktivitet i en populasjon friske frivillige ved rhodamin123-effluksmetoden. Studien viste at P-gp aktiviteten varierte fra 1,0 til 3,8 [75]. Grunnen til at ratioene varierer over et større område enn ratioene funnet i denne oppgaven kan være at Cortada et al. har inkludert et større antall friske frivillige ( $n=61$ ). De har også benyttet verapamil som hemmer av P-gp fremfor zosuquidar, noe som ikke muliggjør direkte sammenligning av ratioer for P-gp aktivitet. Bruk av verapamil burde

teoretisk sett gitt lavere ratioer enn i denne oppgaven, da den er en svakere hemmer enn zosuquidar.

Variasjonen i P-gp aktivitet i endelig metode varierte 2-15% (tabell 8) mellom dager for de ulike forsøkspersonene, mens intradagvariasjonen varierte fra 1-33% (tabell 6). Vanligvis ønskes en lavere variasjon innad en dag enn mellom dager. Grunnen til at variasjonen innad en dag er høyere enn mellom dager er trolig fordi den er basert på absolutte fluorescenstall, mens variasjonen mellom dager er basert på relative tall i form av ratio. Det er forsøkt å standardisere variasjonen mellom dager, men da fluorescenstallene ikke er direkte sammenlignbare lar ikke dette seg gjøre. Det er forsøkt å se om det er noen sammenheng mellom fluorescensintensitet og antall celler, men da celletellingen gjøres forut for aktivitetmålingen, og ikke rett før fluorescensmålingene, blir dette usikkert. En løsning kan eventuelt være å måle celleantallet i hver brønn før måling av fluorescens på mikroplateleser (Victor<sup>TM</sup>). Flow-cytometri er ansett som en god og sensitiv metode for måling av P-gp, da nivået av P-gp uttrykk er lavt i lymfocytter [63]. Ved flow-cytometri kan et nøyaktig celleantall velges, slik at det blir en bedre standardisering av metoden. Døde celler kan utelates fra fluorescensmålingene for ytterligere spesifisitet, da disse avgir fluorescens, men ikke har P-gp aktivitet. Flow-cytometer var ikke tilgjengelig under metodeutviklingen i denne oppgaven, derfor ble ikke det benyttet. Celleantallet anses imidlertid ikke å være av stor betydning for målingen av P-gp aktivitet så lenge interdag-variasjonen i fluorescens mellom parallellene er lav, og forholdet mellom med og uten hemmer varierer lite (figur 11).

Når det gjelder interdag-variasjon i P-gp aktivitet er det viktig å presisere at aktiviteten kan variere fra dag til dag innen en person grunnet naturlig biologisk variasjon. P-gp aktivitet vil også variere mellom personer på grunn av genetikk og andre faktorer som sykdomstilstand og bruk av legemidler [36]. Det er motsigende resultater i forhold til hvordan polymorfismer i genet som koder for P-gp påvirker P-gp aktivitet [40-42]. Det ville dermed være interessant å genotype forsøkspersonene for å se om det er noen sammenheng mellom P-gp aktivitet og eventuelle SNP, da dette kan være med på å forklare interindividuell variasjon i P-gp aktivitet. Det har imidlertid ikke blitt gjort i denne oppgaven. Forholdet mellom alder, kjønn og P-gp aktivitet har blitt studert av Cortada et al. Det ble ikke funnet noen signifikant sammenheng mellom alder og P-gp aktivitet, men menn så ut til å ha høyere P-gp aktivitet enn kvinner [75]. I denne oppgaven ble høyeste ratio i valideringen målt til 1,6. Ratioen ble

målt i en mann, men denne ratioen skiller seg ikke nevneverdig ut i forhold til de andre forsøkspersonene.

Det ser ut til at P-gp blir induisert av flere cytotoksiske stimuli, og er vist å være oppregulert i PBMC ved organtransplantasjon og flere sykdommer [36]. Kreft, reumatoid artritt, SLE og KOLS er eksempler på sykdommer der det er vist en oppregulering av P-gp i PBMC [44, 45, 47-49]. Forsøkspersonene i valideringen var friske individer, men i denne sammenhengen kan det nevnes at en av forsøkspersonene hadde inflammasjon i en skulder ved en av målingene. Den høyeste ratioen for P-gp aktivitet for denne personen ble målt denne dagen. Samtidig bruk av legemidler som er indukere eller hemmere av P-gp kan gi opphav til endret aktivitet av transportøren. P-gp medierte legemiddelinteraksjoner kan føre til endret absorpsjon, biotilgjengelighet, distribusjon og eliminasjon av legemidler som er substrater for P-gp [27]. Ingen av forsøkspersonene brukte legemidler som kan indukere eller hemme P-gp.

P-gp aktivitet ble målt til 1,3, 1,6, og 2,0 hos de tre transplanterte pasientene (figur 13). Da P-gp aktivitet kun er målt i tre pasienter er det vanskelig å konkludere, men det ser ut til at det er noe større variasjon i P-gp aktivitet mellom syke enn mellom friske frivillige. Det er å forvente da transplanterte pasienter har flere faktorer som kan påvirke aktiviteten av P-gp i form av sykdom og bruk av legemidler. Pasient 3 hadde ratio for P-gp aktivitet på 2,0, som var høyest målte verdi hos de 3 pasientene. Denne pasienten ble nyretransplantert for andre gang da første nyre gikk tapt grunnet kronisk allograft nefropati (CAN). CAN er den største grunnen til tap av nyre etter lang tid. CAN er synonymt med kronisk rejeksjon og kjennetegnes ved gradvis nedgang i nyrefunksjon [78]. Nyreskade ser ut til å resultere i en inflammatorisk respons som involverer både lymfocytter, cytokiner og vekstfaktorer [79]. Teoretisk kan dette gi en høyere aktivitet av P-gp da langtidseksponering for inflammatoriske mediatorer ser ut til å oppregulere uttrykk og aktivitet av transportøren [36].

### **5.3 Klinisk nytteverdi**

De immundempende legemidlene karakteriseres av smale terapeutiske vinduer og store intra- og interindividuelle variasjoner i effekt. TDM er dermed nødvendig [54]. Den intensive monitoreringen av immundempende legemidler har gitt en kraftig reduksjon i antall rejeksjonsepisoder [55]. Fremdeles opplever likevel et relevant antall pasienter akutte



releksjoner til tross for tilfredsstillende fullblodskonsentrasjoner. Det har derfor blitt foreslått å monitorere konsentrasjoner av de immundempende legemidlene i PBMC [56]. Tidligere studier har vist ingen eller lav korrelasjon mellom konsentrasjon av immundempende legemidler i fullblod og i PBMC [56, 58, 80, 81]. En av forklaringene på manglende korrelasjon kan være påvirkning av P-gp, som er lokalisert i cellemembranen i lymfocytene. En høy aktivitet av P-gp vil i teorien gi lave konsentrasjoner av det immundempende legemiddelet i PBMC, og kan potensielt føre til releksjon [57]. Få studier har sett på sammenhengen mellom aktivitet av P-gp og konsentrasjon av immundempende legemidler. I en studie gjort av Llaudo et al. har det imidlertid blitt vist en negativ korrelasjon mellom konsentrasjon av ciklosporin (AUC og  $C_{min}$ ) i fullblod og P-gp aktivitet [82]. I tillegg har Ansermot et al. vist en negativ korrelasjon mellom P-gp aktivitet i  $CD4^+$  celler og konsentrasjon av ciklosporin (PBMC AUC) og PBMC/fullblod ratio i friske frivillige, noe som kan tyde på at individer med høy P-gp aktivitet kan ha lavere intracellulære konsentrasjoner av ciklosporin [83]. Sammen med intracellulære konsentrasjonsmålinger og genotyping av *ABCB1* kan bestemmelse av P-gp aktivitet være et viktig bidrag i beskrivelsen av både den intra- og interindividuelle variasjonen av de immundempende legemidlene. Rhodamin123-metoden er imidlertid omfattende og tar 5 timer å gjennomføre. Den er dermed lite egnet som en rutinemessig undersøkelse.

I tillegg til å påvirke den intracellulære effekten av immundempende legemidler er det foreslått at P-gp aktiviteten i nyrene muligens kan påvirke kalsineurinhemmernes nefrotoksisitet, som er en vanlig og alvorlig bivirkning av disse legemidlene [53]. P-gp uttrykkes i nyretubuli og kan redusere eksponeringen av kalsineurinhemmere i nyrevevet ved å øke eliminasjon via urin [22]. Måling av intrarenal konsentrasjon av takrolimus kan være spesielt relevant i forhold til nefrotoksisitet. Teoretisk sett vil dermed en lav P-gp aktivitet i nyrene kunne gi økt akkumulering av legemiddel og fare for nefrotoksisitet [59]. Måling av intrarenal konsentrasjon av takrolimus og P-gp aktivitet kan derfor være spesielt relevant i forhold til nefrotoksisitet [84]. For å kunne måle aktivitet av P-gp i nyreceller må det optimaliseres en metode for måling i disse cellene. Dette kan være vanskelig da nyreceller må isoleres fra biopsier forut for en aktivitetsmåling, og biopsier er ikke like lett tilgjengelige som PBMC fra fullblod.

## 6 Konklusjon

Det er utviklet og optimalisert en metode for måling av P-gp aktivitet. Metoden viser god intra- og interdagpresisjon hos friske frivillige, og er også mulig å applisere på transplanterte pasienter. For mer standardisering av metoden kan måling av fluorescens ved flow-cytometri være egnet. Sammen med intracellulære konsentrasjonsmålinger av immunsuppressiva og genotyping av *ABCB1* vil rhodamin123-effluksmetoden være viktig i beskrivelsen av intra- og interindividuell variasjon i effekten av immunsuppressiva, og forhåpentligvis bidra til kunne forutse reaksjoner bedre i fremtiden.

# Litteraturliste

1. Ross, S., et al., *Promises and challenges of pharmacogenetics: an overview of study design, methodological and statistical issues*. JRSM Cardiovasc Dis, 2012. **1**(1).
2. Rowland, M.T., T.N., *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics - concepts and applications*. Fourth ed. 2011, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
3. Jakovljevic, M., *The placebo-nocebo response: Controversies and challenges from clinical and research perspective*. Eur Neuropsychopharmacol, 2014. **24**(3): p. 333-341.
4. Johnson, J.A., *Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics*. Trends Genet, 2003. **19**(11): p. 660-6.
5. Lin, J.H., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic variability: a daunting challenge in drug therapy*. Curr Drug Metab, 2007. **8**(2): p. 109-36.
6. Brunton, L.L., L.S. Goodman, and A. Gilman, *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 2011, [New York]: McGraw-Hill Medical.
7. Welling, P.G., *Influence of food and diet on gastrointestinal drug absorption: a review*. J Pharmacokinet Biopharm, 1977. **5**(4): p. 291-334.
8. Fleisher, D., et al., *Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications*. Clin Pharmacokinet, 1999. **36**(3): p. 233-54.
9. Verbeeck, R.K. and F.T. Musuamba, *Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction*. European journal of clinical pharmacology, 2009. **65**(8): p. 757-773.
10. Lam, Y.W., et al., *Principles of drug administration in renal insufficiency*. Clin Pharmacokinet, 1997. **32**(1): p. 30-57.
11. Matzke, G.R. and R.F. Frye, *Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity*. Drug Saf, 1997. **16**(3): p. 205-31.
12. Verbeeck, R.K., *Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction*. European journal of clinical pharmacology, 2008. **64**(12): p. 1147-1161.
13. Zanger, U.M. and M. Schwab, *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*. Pharmacol Ther, 2013. **138**(1): p. 103-41.
14. Lin, J.H., *Tissue distribution and pharmacodynamics: a complicated relationship*. Curr Drug Metab, 2006. **7**(1): p. 39-65.
15. Marzolini, C., M. Battegay, and D. Back, *Mechanisms of drug interactions II: transport proteins*, in *Drug Interactions in Infectious Diseases*. 2011, Springer. p. 43-72.
16. Giacomini, K.M., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
17. Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. Genome Res, 2001. **11**(7): p. 1156-66.
18. Gill, D.R., et al., *Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein*. Cell, 1992. **71**(1): p. 23-32.
19. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(1): p. 152-62.

20. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 67-113.
21. Vasiliou, V., K. Vasiliou, and D.W. Nebert, *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. Hum Genomics, 2009. **3**(3): p. 281-90.
22. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7735-8.
23. Klimecki, W.T., et al., *P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers*. Blood, 1994. **83**(9): p. 2451-8.
24. Cordon-Cardo, C., et al., *Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(2): p. 695-8.
25. Fu, D., *Where is it and How Does it Get There - Intracellular Localization and Traffic of P-glycoprotein*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 321.
26. Fromm, M.F., *Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(8): p. 423-9.
27. Zhou, S.F., *Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition*. Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 802-32.
28. Richert, N.D., et al., *Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells*. Biochemistry, 1988. **27**(20): p. 7607-13.
29. Panagiotopoulou, V., et al., *On a biophysical and mathematical model of Pgp-mediated multidrug resistance: understanding the "space-time" dimension of MDR*. Eur Biophys J, 2010. **39**(2): p. 201-11.
30. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39706-10.
31. Callaghan, R., R.C. Ford, and I.D. Kerr, *The translocation mechanism of P-glycoprotein*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1056-63.
32. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs?* J Membr Biol, 1997. **160**(3): p. 161-75.
33. Tempestilli, M., et al., *Determination of P-glycoprotein surface expression and functional ability after in vitro treatment with darunavir or raltegravir in lymphocytes of healthy donors*. Int Immunopharmacol, 2013. **16**(4): p. 492-7.
34. Seelig, A., *A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein*. Eur J Biochem, 1998. **251**(1-2): p. 252-61.
35. Kim, R.B., *Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers*. Drug Metab Rev, 2002. **34**(1-2): p. 47-54.
36. Christensen, H. and M. Hermann, *Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 8.
37. Ieiri, I., *Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2)*. Drug Metab Pharmacokinet, 2012. **27**(1): p. 85-105.
38. Hoffmeyer, S., et al., *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3473-8.
39. Hitzl, M., et al., *The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(4): p. 293-8.

40. Vafadari, R., et al., *Genetic polymorphisms in ABCB1 influence the pharmacodynamics of tacrolimus*. Ther Drug Monit, 2013. **35**(4): p. 459-65.
41. Sakaeda, T., et al., *MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects*. Pharm Res, 2001. **18**(10): p. 1400-4.
42. Kurata, Y., et al., *Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein*. Clin Pharmacol Ther, 2002. **72**(2): p. 209-19.
43. Wang, D., et al., *Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability*. Pharmacogenet Genomics, 2005. **15**(10): p. 693-704.
44. Tsujimura, S. and Y. Tanaka, *Treatment strategy based on targeting P-glycoprotein on peripheral lymphocytes in patients with systemic autoimmune disease*. Clin Exp Nephrol, 2012. **16**(1): p. 102-8.
45. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 48-58.
46. Langford, D., et al., *Altered P-glycoprotein expression in AIDS patients with HIV encephalitis*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. **63**(10): p. 1038-47.
47. Yudoh, K., et al., *Increased expression of multidrug resistance of P-glycoprotein on Th1 cells correlates with drug resistance in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(9): p. 2014-5.
48. Hodge, G., et al., *The drug efflux pump Pgp1 in pro-inflammatory lymphocytes is a target for novel treatment strategies in COPD*. Respir Res, 2013. **14**(1): p. 63.
49. Donnenberg, V.S., et al., *P-glycoprotein (P-gp) is upregulated in peripheral T-cell subsets from solid organ transplant recipients*. J Clin Pharmacol, 2001. **41**(12): p. 1271-9.
50. Tsujimura, S., et al., *Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes*. Genes Cells, 2004. **9**(12): p. 1265-73.
51. Molden, E., *P-glykoprotein-en pumpe av betydning for legemiddelrespons*. TIDSSKRIFT-NORSKE LAEGEFORNING, 2004. **124**: p. 2921-2923.
52. Gaston, R.S., *Current and evolving immunosuppressive regimens in kidney transplantation*. Am J Kidney Dis, 2006. **47**(4 Suppl 2): p. S3-21.
53. Naesens, M., D.R. Kuypers, and M. Sarwal, *Calcineurin inhibitor nephrotoxicity*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2009. **4**(2): p. 481-508.
54. Venkataramanan, R., et al., *Clinical pharmacokinetics of tacrolimus*. Clin Pharmacokinet, 1995. **29**(6): p. 404-30.
55. Wallemacq, P.E., *Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we?* Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(11): p. 1204-11.
56. Lemaitre, F., M. Antignac, and C. Fernandez, *Monitoring of tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells: application to cardiac transplant recipients*. Clin Biochem, 2013. **46**(15): p. 1538-41.
57. Gotzl, M., et al., *MDR1 gene expression in lymphocytes of patients with renal transplants*. Nephron, 1995. **69**(3): p. 277-80.
58. Falck, P., et al., *Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients*. Transplantation, 2008. **85**(2): p. 179-84.
59. Naesens, M., et al., *Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(11): p. 2468-80.

60. Metalidis, C., et al., *Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity*. Transplantation, 2011. **91**(10): p. 1098-102.
61. Joy, M.S., et al., *Calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and renal expression of P-glycoprotein*. Pharmacotherapy, 2005. **25**(6): p. 779-89.
62. Parasrampur, D.A., et al., *Effect of calcineurin inhibitor therapy on P-gp expression and function in lymphocytes of renal transplant patients: a preliminary evaluation*. J Clin Pharmacol, 2002. **42**(3): p. 304-11.
63. Parasrampur, D.A., M.V. Lantz, and L.Z. Benet, *A human lymphocyte based ex vivo assay to study the effect of drugs on P-glycoprotein (P-gp) function*. Pharm Res, 2001. **18**(1): p. 39-44.
64. Frohlich, M., et al., *In vitro and ex vivo evidence for modulation of P-glycoprotein activity by progestins*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(12): p. 2409-16.
65. Albermann, N., et al., *Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(6): p. 949-58.
66. Nilsson, C., et al., *Optimal blood mononuclear cell isolation procedures for gamma interferon enzyme-linked immunospot testing of healthy Swedish and Tanzanian subjects*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(4): p. 585-9.
67. Mallone, R., et al., *Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society*. Clin Exp Immunol, 2011. **163**(1): p. 33-49.
68. Green, L.J., P. Marder, and C.A. Slapak, *Modulation by LY335979 of P-glycoprotein function in multidrug-resistant cell lines and human natural killer cells*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(11): p. 1393-9.
69. Feller, N., et al., *Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry*. Br J Cancer, 1995. **72**(3): p. 543-9.
70. Hamada, A., et al., *Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(2): p. 824-8.
71. Homolya, L., et al., *Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21493-6.
72. Troost, J., et al., *Cholesterol modulates P-glycoprotein activity in human peripheral blood mononuclear cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(3): p. 705-11.
73. Dantzig, A.H., et al., *Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(2): p. 854-62.
74. Starling, J.J., et al., *Pharmacological characterization of LY335979: a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator of P-glycoprotein*. Adv Enzyme Regul, 1997. **37**: p. 335-47.
75. Cortada, C.M., et al., *Lymphocyte P-glycoprotein variability in healthy individuals*. Medicina (B Aires), 2009. **69**(6): p. 619-24.
76. Tanaka, S., et al., *P-glycoprotein function in peripheral blood mononuclear cells of myasthenia gravis patients treated with tacrolimus*. Biol Pharm Bull, 2007. **30**(2): p. 291-6.

77. FDA, C., *Guidance for industry: bioanalytical method validation*. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV), 2001.
78. Vadivel, N., S.G. Tullius, and A. Chandraker, *Chronic allograft nephropathy*. Semin Nephrol, 2007. **27**(4): p. 414-29.
79. Kais, H. (2011). *Chronic Allograft Nephropathy, After the Kidney Transplant - The Patients and Their Allograft*, Prof. Jorge Ortiz (Ed.), ISBN: 978-953-307-807-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/after-the-kidney-transplant-the-patients-and-their-allograft/chronic-allograft-nephropathy>.
80. Robertsen, I., et al., *Endomyocardial, intralymphocyte, and whole blood concentrations of ciclosporin A in heart transplant recipients*. Transplant Res, 2013. **2**(1): p. 5.
81. Capron, A., et al., *Correlation of tacrolimus levels in peripheral blood mononuclear cells with histological staging of rejection after liver transplantation: preliminary results of a prospective study*. Transpl Int, 2012. **25**(1): p. 41-7.
82. Llaudo, I., et al., *Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study*. Transpl Int, 2013. **26**(2): p. 177-86.
83. Ansermot, N., et al., *Influence of ABCB1 gene polymorphisms and P-glycoprotein activity on cyclosporine pharmacokinetics in peripheral blood mononuclear cells in healthy volunteers*. Drug Metab Lett, 2008. **2**(2): p. 76-82.
84. Hesselink, D.A., et al., *The role of pharmacogenetics in the disposition of and response to tacrolimus in solid organ transplantation*. Clin Pharmacokinet, 2014. **53**(2): p. 123-39.

# Appendiks

## Appendiks A: Laboratorie-protokoll

### ISOLERING AV PBMCs og Pgp-aktivitet

#### *Blodprøvetapping*

1. Tapp blod i EDTA-rør (lilla)
2. Vend rørene 8-10 ganger etter tappingen

#### *Celleisolering ved gradientsentrifugering*

3. Bland EDTA blod 1:1 (sånn ca.) med PBS i 14 mL Falcon rør (maks totalvolum: 8 mL). Hold røret på skrå og tilsett forsiktig kald PBS. Kork på trykkes godt på. Bland forsiktig.
4. Overfør fortynnet blod til Leucosep-rør (helle forsiktig)
5. Sentrifugering 1000 g, 10 minutter, brems 4 (innsats som svinger ut)
6. Pipetter av det øverste laget til det er igjen ca 5 mm over PBMC laget
7. Pipetter sjikt med PBMC til 14 mL Falcon rør (ta to og to sjikt sammen i et rør)

#### *Vask med PBS*

8. Tilsett 10 mL PBS til Falcon røret, blandes ved å vende røret 6 ganger. Ved tilsetting av PBS hold røret på skrå og tilsett forsiktig PBS
9. Sentrifuger 300 g, 10 minutter (innsats som svinger ut)
10. Fjern supernatant. Rist litt forsiktig på røret
11. Nytt vasketrinn. Tilsett 10 mL PBS til Falcon røret, blandes ved å vende røret 6 ganger. Ved tilsetting av PBS hold røret på skrå og tilsett forsiktig PBS
12. Sentrifuger 300 g, 10 minutter (innsats som svinger ut)
13. Fjern supernatant. Rist litt forsiktig på røret.
14. Reløs hver pellet i 500  $\mu$ L PBS
15. Slå sammen alle pelletene i et rør. Totalvolum \_\_\_\_\_



### *Celletelling*

16. Tell cellene ved automatisk celleteller. Bland 10  $\mu\text{L}$  celleduspensjon + 10  $\mu\text{L}$  tryptanblå. Sett 10  $\mu\text{L}$  på cellekammeret. ( 3 tellinger – ta gjennomsnitt).

a. Total cellekonsentrasjon: \_\_\_\_\_

b. Levende celler: \_\_\_\_\_

c. Døde celler: \_\_\_\_\_

d. Viabilitet: \_\_\_\_\_

17. Total cellekonsentrasjon manuell telling: Bland 20  $\mu\text{L}$  celleduspensjon + 20  $\mu\text{L}$  tryptanblå. Sett 20  $\mu\text{L}$  på cellekammeret. ( 4 tellinger – ta gjennomsnitt).

Antall celler telling 1:

Antall celler per mL:

Antall celler telling 2:

Gjennomsnitt x 2,7

100

Antall celler telling 3:

Antall celler telling 4:

18. Sentrifuger 500 g, 10 minutter. Kast supernatant

19. Reløs i 250  $\mu\text{L}$  RPMI + 2 % FCS\* antall prøver i forsøket (250  $\mu\text{L}$ \*8 = 2 mL)

20. Fordel celleduspensjon på 8 eppendorfrør

## **Rhodamin123-forsøk**

21. 250  $\mu$ L **RPMI + 2 % FCS med 0,8  $\mu$ M Rho123** tilsettes etter følgende skjema:
  - a. Med hemmer  $\rightarrow$  250  $\mu$ L **RPMI + 2 % FCS med 0,8  $\mu$ M Rho123 (3 paralleller)**
  - b. Uten hemmer  $\rightarrow$  250  $\mu$ L **RPMI + 2 % FCS med 0,8  $\mu$ M Rho123 (3 paralleller)**
  - c. Blank kontroll (uten Rho123 eller ZOS)  $\rightarrow$  500  $\mu$ L **RPMI + 2 % FCS (2 paralleller)**
22. **Inkuberes** i 30 minutter ved 37 °C på ristebad
23. **Sentrifuger** ved 500 g i 10 min. Kast supernatant. Sug av resterende væske med pipette
24. **Vask:** 1 gang med 1 mL iskaldt RPMI + 2 % FCS. Kast supernatant
25. **Sentrifuger** ved 500 g i 10 min. Kast supernatant. Sug av resterende væske med pipette
26. Resuspenderte cellene i følgende:
  - a. Med hemmer  $\rightarrow$  500  $\mu$ L **RPMI + 2% FCS med 1  $\mu$ M Zosuquidar (3 paralleller)**
  - b. Uten hemmer  $\rightarrow$  500  $\mu$ L **RPMI + 2% FCS (3 paralleller)**
  - c. Blank kontroll (Uten Rhodamin og Zosuquidar)  $\rightarrow$  500  $\mu$ L **RPMI + 2% FCS (2 paralleller)**
27. Inkuberes i 1 time ved 37 °C på ristebad
28. **Sentrifuger** ved 500 g i 10 min 4°C. Kast supernatant
29. **Vask:** 1 gang med 1 mL iskald **PBS + 2 % FCS.**
30. **Sentrifuger** ved 500 g i 10 min 4°C. Kast supernatant. Sug av resterende væske med pipette
31. Resuspender cellene i 250  $\mu$ L **PBS + 2 % FCS**
32. 200  $\mu$ L pipetteres av til sort brønn. Fluorescens leses av på VICTOR

# Appendiks B: Poster

For Norsk selskap for Farmakologi og Toksikologi (NSFT), Vintermøte Beitostølen 2014

## Aktivitet av P-glykoprotein i mononukleære celler fra perifert blod

Kathrine Ahlsen<sup>1</sup>, Ida Robertsen<sup>1</sup>, Anders Åsberg<sup>1,2</sup>, Hege Christensen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

<sup>2</sup>Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet



### Problemstilling

P-glykoprotein (P-gp), en ATP-avhengig efflukspumpe lokalisert blant annet i lymfocytter, har som funksjon å beskytte celler og vev mot fremmedstoffer. Immunsuppressive legemidler som ciklosporin, takrolimus og everolimus, har sitt virkested intracellulært i lymfocytter. Siden disse legemidlene er substrater for P-gp kan denne transportøren teoretisk påvirke den intracellulære konsentrasjonen i lymfocytter og da også deres immundependende effekt<sup>1</sup>. Måling av intracellulære konsentrasjoner og bestemmelse av P-gp aktivitet *ex vivo* vil dermed kunne være med på å gi relevant informasjon for individuell immundependende behandling i transplanterte pasienter. Hensikten med dette arbeidet var å utvikle og validere en *ex vivo* metode for bestemmelse av P-gp aktivitet i lymfocytter fra nyretransplanterte pasienter.

### Metode

- Humane perifere mononukleære blodceller (PBMC) ble isolert fra perifert fullblod (fra friske frivillige) ved tetthetsgradientsentrifugering.
- De isolerte cellene ble inkubert med det fluoriserende P-gp substratet rhodamin 123 (Figur 1) i et Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-medium i 30 minutter ved 37°C. Ulikt antall celler ble testet underveis i metodeutviklingen.
- Cellene ble vasket med RPMI og 2% fetal kalveserum (FCS) og sentrifugert. Ulike sentrifugeringshastigheter og tider ble testet.
- Lymfocytene ble inkubert (60 minutter, 37°C) med eller uten den selektive hemmeren av P-gp (zosuquidar). Zosuquidar hindrer rhodamin 123 å bli pumpet ut av cellen via P-gp (Figur 2). Ulike konsentrasjoner av zosuquidar ble testet i optimaliseringsprosessen.
- Cellene ble vasket med fosfatbufret fysiologisk saltvann (PBS) og 2% FCS før fluorescens ble målt på en mikroplateleser (Victor™).
- P-gp aktivitet ble bestemt ved å beregne ratio av rhodamin 123 fluorescens med og uten zosuquidar. Alle forsøk ble utført med 3 paralleller.

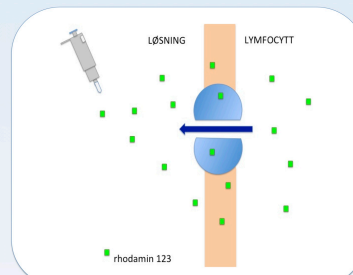
### Resultater og Diskusjon

- Optimaliseringsprosessen av metoden viste at:
  - 1 µM zosuquidar er best egnet for bestemmelse av P-gp aktivitet (Figur 3).
  - Anvendelse av en sentrifugeringshastighet på 500 g i 10 minutter er optimalt.
  - Antall lymfocytter som inkuberes er av betydning, og standardisering av 1\*10<sup>6</sup> celler i inkubasjonen ga tilfredsstillende resultater.
- Den optimale metoden ga ulik P-gp aktivitet i individene (Tabell 1), noe som indikerer at det er en interindividuell variabilitet (7,5%) i P-gp aktivitet i lymfocytter.
- Imidlertid var det noe intraindividuell variasjonen i forsøkene, og videre studier må utføres for å optimalisere metoden.

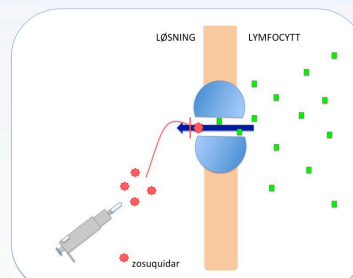
Tabell 1: P-gp aktivitet hos friske frivillige.

Data er presentert som ratio av rhodamin 123 fluorescens med og uten zosuquidar.

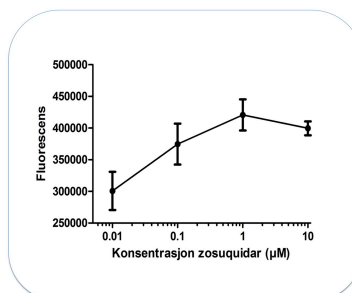
Ratio P-gp aktivitet				
	Individ 1	Individ 2	Individ 3	Individ 4
Forsøk 1	1,49	1,11	1,64	1,52
Forsøk 2	1,37	2,41	1,49	1,97
Forsøk 3	1,97	1,21	1,24	-
Gjennomsnitt	1,61	1,58	1,46	1,75
Standardavvik	0,32	0,72	0,20	0,32
CV (%)	19,7	45,9	13,9	18,2



Figur 1: Rhodamin 123 tilsettes løsningen, diffunderer passivt over membranen og pumpes aktivt ut av P-gp.



Figur 2: Zosuquidar hemmer P-gp og rhodamin 123 forblir inne i cellen.



Figur 3: Effekt av hemmerkonsentrasjon av zosuquidar på P-gp aktivitet.

### Veien videre...

Det er utviklet en metode for å måle aktiviteten av P-gp i lymfocytter. Videre optimalisering av metoden er imidlertid nødvendig før den kan benyttes på pasienter.

#### Referanser

<sup>1</sup>Falck, P., et al., *Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients*. Transplantation, 2008. 85(2): p. 179-184.